

09/807132

PCT/JP99/05578

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

08.10.99

REC'D 26 NOV 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年12月 7日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第347546号

出 願 人
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所

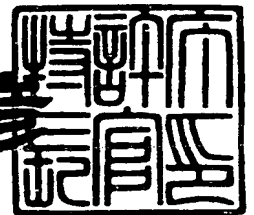
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3078037

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-012

【提出日】 平成10年12月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 新規G蛋白質結合型受容体、G T A R 1 1

【請求項の数】 19

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 前田 正嗣

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 中田 靖彦

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 野村 仁

【特許出願人】

 【識別番号】 596102791

 【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

 【代表者】 大杉 義征

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 G 蛋白質結合型受容体、G T A R 1 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：5 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 2】 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 3】 配列番号：7 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：7 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 4】 配列番号：8 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：8 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 5】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 6】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 7】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：7 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 8】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダ

イズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか1項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質。

【請求項10】 配列番号：5～8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチド。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか1項に記載の蛋白質またはペプチドをコードするDNA。

【請求項12】 請求項11に記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項13】 請求項11に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項14】 請求項13に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

【請求項15】 請求項1～9に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) 請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項16】 請求項1～9に記載の蛋白質に結合するリガンドおよび／またはアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質を表面に発現させた細胞に被験試料を接触させる工程、

(b) 該細胞内の生化学的变化を測定する工程、および

(c) 該細胞内の生化学的变化を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項17】 請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体。

【請求項18】 請求項17に記載の抗体と、請求項1～9のいずれか1項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質

との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該蛋白質の検出又は測定方法。

【請求項 19】 配列番号：1～4のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な G 蛋白質結合型受容体蛋白質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまでに、Olfactory 受容体 (OR) 遺伝子ファミリーは生体の嗅覚応答機構を司る Odorant 受容体をコードしている多重遺伝子ファミリーとして知られている。同遺伝子の発見は、1991 年にラットの嗅覚感作神経細胞での発現が観察された報告 (Buck, L. et al. Cell 65, 175-187, 1991) が最初であるが、その後、生物種を越えて、イヌ (Permentier, M. et al. Nature 355, 453-455, 1992)、マウス (Ressler, K.J. et al. Cell 73, 597-609, 1993)、ヒト (Selbie, L.A. et al. Mol. Brain Res. 13, 159-163, 1992)、ナマズ (Ngai, J. et al. Cell 72, 657-666, 1993)、カエル (Freitag, J. et al. Neuron 15, 1383-1392, 1995) においても、相次いで相同遺伝子群が見出されている。同遺伝子群がコードする受容体蛋白質は、他の G 蛋白質結合型受容体スーパーファミリーと同様

に 7 回膜貫通型の構造的特徴を持ち、共通して第 1 細胞外領域に糖修飾を受ける [N-x-S / T] (x は任意のアミノ酸) モチーフが存在する。また、第 2 細胞外領域 (ループ-1) と第 3 細胞外領域 (ループ-2) は、互いの保存されたシステイン残基によりジスルフィド結合で架橋されている。さらに機能的に重要であることが予測される共通モチーフとして第 2 細胞内領域の [M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C] 配列が見出され、特にこの [D-R-Y] モチーフが細胞内の G 蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている (Rosenthal, W. et al. J. Biol. Chem. 268, 13030-13033, 1993, Marchese, A. et al. Genomics 23, 609-618, 1994)。

【0003】

一方、Odorant受容体群に対するリガンドに関しては、例えばodourリガンドや神経ペプチド様因子の存在が推測されてはいるが、現在のところ全く不明である (Buck, L. et al. Cell 65, 175-187, 1991, Ngai, J. et al. Cell 72, 657-666, 1993)。また、そのシグナル伝達についても、G 蛋白質との結合が指摘されている以外は、ほとんど知見はなく、今後の機能解析が望まれている。最近になって構造的親近性より、同遺伝子群の全体を大きく8種類のサブファミリーに分類することが提唱されてはいるが、それが必ずしも機能的分類との相関性を決定できるとは考え難い。また、ヒトにおいて同遺伝子群は、約1000コピー近く存在することが予測されているにもかかわらず、そのうち約70%は偽遺伝子であることが推定されている (Sylvie, R. et al. Nature Gen. 18, 243-250, 1998)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、Olfactory受容体(OR)遺伝子ファミリー間で高い相同性を認められる第2細胞膜貫通領域の保存されたアミノ酸配列を抽出した。次いで、該配列を質問式としたBlast検索を行い、GenBankのnrデータベースから該配列と高い相同性を示す複数のヒトゲノム配列を見出した。このゲノム配列に基づき設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRを、ヒト各臓器由来の mRNA を鋳型として実施することにより、これら標的遺伝子の部分cDNA配列を得ると共に、各臓器におけるこれら遺伝子の発現分布及び発現様態の評価を行った。さらにRT-PCRにおいて高い遺伝子発現が認められたヒト精巣に由来するcDNA ライブラリーを鋳型として、5' -RACE 法及び3' -RACE 法を実施することにより、それぞれGTAR11-1、GTAR11-2、GTAR11-3、およびGTAR11-4と命名された4つのcDNAクローンを単離することに成功した。

【0006】

これら遺伝子は新規な7回膜貫通型G蛋白質結合型受容体をコードし、既知のOrf1factory 受容体(OR)遺伝子ファミリーの特徴を満足させるものであった。これら遺伝子のヒト各臓器での発現分布を解析した結果、GTAR11-1は、胸腺、脾臓、末梢リンパ球といったリンパ造血系、小腸、結腸などの消化管、及び精巣と胎盤において特に強く検出された。GTAR11-2は、胸腺、末梢リンパ球といったリンパ造血系、及び精巣と胎盤において特に強く検出された。GTAR11-3は、胸腺、脾臓といったリンパ造血系及び生殖器系において特に強く検出された他、小腸、結腸などの消化管、筋肉、神経系においても幅広く検出された。GTAR11-4は、胸腺、脾臓といったリンパ造血系、及び生殖器系において特に強く検出された他、小腸、結腸などの消化管、及び内分泌系などにおいても幅広い発現分布が認められた。

【0007】

このような発現特性等から、これら遺伝子がコードする蛋白質は、リンパ造血系や内分泌系で重要な機能を担うことが予測され、新規造血性ペプチド因子の検索などに利用しうると考えられた。

【0008】

本発明は、新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：5に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(2) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(3) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：7に記

載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(4) 配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(5) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(6) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(7) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(8) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(9) (1)～(8)のいずれか1項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質、

(10) 配列番号：5～8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチド、

(11) (1)～(10)のいずれか1項に記載の蛋白質またはペプチドをコードするDNA、

(12) (11)に記載のDNAが挿入されたベクター、

(13) (11)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(14) (13)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)～(10)のいずれか1項に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(15) (1)～(9)に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(16) (1) ~ (9) に記載の蛋白質に結合するリガンドおよび／またはアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の蛋白質を表面に発現させた細胞に被験試料を接触させる工程、

(b) 該細胞内の生化学的変化を測定する工程、および

(c) 該細胞内の生化学的変化を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法、

(17) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体、

(18) (17) に記載の抗体と、(1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該蛋白質の検出又は測定方法、

(19) 配列番号：1 ~ 4 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA、を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明者らにより単離された GTAR11-1 cDNA、GTAR11-2 cDNA、GTAR11-3 cDNA、GTAR11-4 cDNA の塩基配列をそれぞれ配列番号：1、2、3、4 に、また、これら cDNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：5、6、7、8 に示す。

【0010】

OR 遺伝子ファミリーに属する受容体蛋白質は、他の G 蛋白質結合型受容体蛋白質と同様に、7 回膜貫通型の構造的特徴を持ち、共通して第 1 細胞外領域に糖修飾を受ける [N-x-S / T] (x は任意のアミノ酸) モチーフを有する。また、第

2細胞外領域(ループ-1)と第3細胞外領域(ループ-2)には、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基を有し、さらにG蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の[M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C] 配列(特に該配列内の[D-R-Y] モチーフ)を有している(Rosenthal, W. et al. J. Biol. Chem. 268, 13030-13033, 1993、Marchese, A. et al. Genomics 23, 609-618, 1994)。

【0011】

本発明者らにより単離された上記4つの遺伝子がコードする蛋白質(以下、「GTAR11蛋白質」と称する)は、細胞膜蛋白質であり、その配列中に7箇所の疎水性膜貫通領域を保有する7回膜貫通型受容体である。

【0012】

また、GTAR11蛋白質は、既知のOdorant受容体同様に、上記のG蛋白質結合型受容体蛋白質に特徴的なモチーフを有する。即ち、第1細胞外領域に糖修飾を受ける[N-x-S/T]モチーフ(xは任意のアミノ酸)として、GTAR11-1蛋白質は[N-Y-S]配列を、GTAR11-2蛋白質、GTAR11-3蛋白質、およびGTAR11-4蛋白質は[N-S-T]配列を有していた。また共通して、第2細胞外領域(ループ-1)と第3細胞外領域(ループ-2)の保存されたシステイン残基を有していた。さらに、これらすべてのタンパク質がG蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の[M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C]配列として[M-A-Y-D-R-Y-L-A-I-C]配列を有していた。

【0013】

これらの特徴から、GTAR11蛋白質は、他のG蛋白質結合型受容体蛋白質と同様に、細胞外からのリガンド刺激に応答して、細胞内のG蛋白質と結合することによりその機能を発現していると考えられる。

【0014】

なお、配列番号:5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、完全なGTAR11-1タンパク質ではないが、図13に示すように、[N-x-S/T]モチーフ(xは任意のアミノ酸)、保存されたシステイン残基、[M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C]モチーフなどのG蛋白質結合型受容体の機能に重要な構造を有していた。従って、該

タンパク質は、リガンドのスクリーニングなどに利用しうると考えられる。また、該タンパク質は、G蛋白質結合型受容体としての活性を有すると考えられる。

【0015】

また、RT-PCRによる発現解析により、GTAR11遺伝子は、特に胸腺と精巣において強い発現が観察された（実施例3、図5から8）。この事実は、これらGTAR11蛋白質が特定集団のリンパ球細胞群における分化調節や、増殖及び活性化調節を担っている可能性を示唆するものである。これは即ち、GTAR11蛋白質が、リガンド刺激に応答し、G蛋白質との相互作用を介することによって、リンパ球に特徴的な活性の調節を司る、中枢分子として機能し得ることを強く示唆している。また、常に細胞周期が回転しており、いわゆる周期ターンオーバーの速い精巣の特質を考えると、これら蛋白質が細胞周期や分裂を機能制御し得る可能性も予測される。

【0016】

一方、GTAR11遺伝子の発現は、造血細胞を含むと予測される、末梢白血球において認められた。さらに、GTAR11-1遺伝子、GTAR11-3遺伝子、およびGTAR11-4遺伝子においては、造血細胞を含むと予測される、脾臓でも発現が認められた。このことは、構造的に既知Odorant受容体と類似性を示すGTAR11蛋白質が、新規造血調節因子受容体として機能し得る可能性を示唆するものである。

【0017】

免疫担当細胞において中枢的機能責任を担いうるGTAR11蛋白質には、以下の疾患領域における臨床応用が考えられる。

【0018】

まず、第一にGTAR11蛋白質に機能結合しうる、生体由来のリガンドやアゴニスト、あるいはGTAR11蛋白質の機能を活性化しうる特異的抗体の生体投与により、GTAR11蛋白質の活性亢進を促すことによって、生体の細胞性免疫を増強しうると予測される。即ち、上記のような機能結合物質は免疫担当細胞、中でも特にT細胞群の増殖促進剤、分化促進剤、あるいは免疫細胞機能活性化剤としての臨床応用が可能である。これは即ち、腫瘍免疫や感染免疫といった生体免疫応答の促進を意味するものであり、具体的には、ある特定種の癌組織に対する細胞障害性免

疫を高めることが可能であり、また、感染症に対する生体の免疫抵抗性を高めることで、HCVやHIVといった各種ウィルス感染に対する抵抗力の増強を誘導しうる。

【0019】

第二にGTAR11蛋白質に機能結合しうる、アンタゴニストやその他の阻害剤、あるいはGTAR11蛋白質の機能を阻害しうる特異的抗体の生体投与により、GTAR11蛋白質の活性阻害を促すことによって、生体の細胞性免疫を抑制しうると予測される。即ち、このような阻害物質は免疫担当細胞、中でも特にT細胞群の増殖抑制剤、分化抑制剤、あるいは免疫抑制剤や抗炎症剤としての臨床応用が可能である。これは即ち、自己組織傷害性が起因する自己免疫疾患発生の抑制や、移植免疫の領域において最大の問題となる、生体免疫による組織拒絶応答の抑制を意味するものであり、具体的には、糖尿病や肝傷害、コラーゲン関節炎、GVHD、EAEといった免疫応答の異常亢進により誘導された疾患領域に対して、極めて有効であると考えられる。あるいは、金属や花粉などに対する種々の抗原特異的アレルギーに対しても、上記阻害剤による免疫抑制による解決が有効であると考えられる。

【0020】

本発明はまた、上記GTAR11蛋白質と機能的に同等な蛋白質をも包含する。本発明において「機能的に同等」とは、蛋白質が、GTAR11蛋白質と同等の生物学的活性を有することを指す。生物学的活性としては、例えば、G蛋白質結合型受容体蛋白質活性、即ち、リガンド刺激に応答して細胞内のG蛋白質と相互作用することにより、細胞外から細胞内へのシグナル伝達を行う活性である。

【0021】

このような蛋白質を得るための方法としては、例えば、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、蛋白質中のアミノ酸配列に所望の変異を導入することができる (Kramer, W. and Fritz, H. J. Methods in Enzymol. (1987) 154, 350-367)。また、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBC O-BRL製) を使用して、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入することもできる。

。これらの方法により、GTAR11蛋白質（配列番号：5から8）において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾された、GTAR11蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。また、タンパク質中のアミノ酸の変異は自然界において生じることもある。

【0022】

GTAR11蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号：5から8のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：5から8のいずれかに示されるアミノ酸配列に1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号：5から8のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

【0023】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1982) 79, 6409-6413）。

【0024】

配列番号：5から8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質として、例えば、GTAR11蛋白質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、GTAR11蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、GTAR11蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させ

ればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

【0025】

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (198) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えばGST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

【0026】

本発明の蛋白質はまた、配列番号：1から4のいずれかに示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされており、且つGTAR11蛋白質と機能的に同等な蛋白質を含む。ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

【0027】

また、本発明にはGTAR11蛋白質と機能的に同等であり、且つ該蛋白質のアミノ酸配列(配列番号：5から8)と相同性を有する蛋白質も含まれる。相同性を有する蛋白質とは、配列番号：5から8のいずれかに示されるアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列上の相同性を有する蛋白質を

意味する。蛋白質の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0028】

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異り得る。しかしながら、得られた蛋白質がG蛋白質結合型受容体蛋白質活性を有している限り、本発明に含まれる。

【0029】

本発明の蛋白質を製造するには、得られたDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる。

【0030】

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明の蛋白質をコードするDNA、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0031】

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウイルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1 α (HEF1 α) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

【0032】

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使

用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0033】

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0034】

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

【0035】

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0036】

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター (例えばpEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えばpBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えばpHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えばpZIpneo)、酵母由来の発現ベクター (例えばpNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えばpPL608、pKTH50

）、大腸菌由来の発現ベクター（例えばpQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2）が挙げられる。

【0037】

本発明のベクターは、in vivoやin vitroで本発明の蛋白質を製造するのみならず、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いることもできる。

【0038】

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法（Virology (1973) 52, 456-467）やエレクトロポレーション法（EMBO J. (1982) 1, 841-845）等が用いられる。

【0039】

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0040】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばCHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220）やCHO K-1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）を好適に使用することができる。

【0041】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス（Saccharomyces）属、例えばサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、糸状菌、例えばアスペルギルス属（Aspergillus）属、例えばアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）が知られている

【0042】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

【0043】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0044】

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0045】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0046】

例えば、目的とするDNAをヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12

， 699-702 ）。

【 0047 】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る（Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594 ）。

【 0048 】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る（Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138）。

【 0049 】

これにより得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

【 0050 】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の

液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

【0051】

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0052】

本発明はまた、GTAR11蛋白質の部分ペプチドを含む。部分ペプチドとしては、例えば、GTAR11遺伝子がコードするペプチドのうち、生体内に存在するリガンドとの結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、生体投与することで、本来のリガンドと拮抗的に結合し、GTAR11蛋白質とリガンドとの結合を競合阻害することが可能である。また、同様にG蛋白質との結合部位に相当する部分ペプチドを用いれば、GTAR11蛋白質と細胞内G蛋白質との結合を拮抗的に競合阻害することが可能である。これら部分ペプチドは、GTAR11蛋白質を介したシグナル伝達の阻害剤として有用である。

【0053】

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

【0054】

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、本明細書に記載のプロープを用いヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。

【0055】

得られたcDNA又はcDNA断片をプロープとして、さらにcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種からcD

NAを得ることができる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

【0056】

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてジェノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミックDNAを単離することができる。

【0057】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0058】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【0059】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニ

ーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

【0060】

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン(ATG)及び/又は終止コドン(TAA、TGA又はTAG)の挿入等が挙げられる。

【0061】

本発明のDNAは、具体的には配列番号：1の塩基配列において17位の塩基Aから760位の塩基GからなるDNA、配列番号：2の塩基配列において18位の塩基Aから956位の塩基CからなるDNA、配列番号：3の塩基配列において18位の塩基Aから956位の塩基CからなるDNA、および配列番号：4の塩基配列において19位の塩基Aから945位の塩基CからなるDNAを包含する。

【0062】

本発明のDNAはまた、配列番号：1から4のいずれかに示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

【0063】

ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは、cDNAまたは

染色体DNAである。

【0064】

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

【0065】

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜画分としての形態であってもよい。

【0066】

また、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物としては、天然由来であっても、人工的に合成された化合物であってもよい。天然由来の化合物としては、例えば、本発明の蛋白質に結合するリガンドが挙げられる。本発明において「リガンド」とは、本発明の蛋白質に結合することにより、本発明の蛋白質を発現する細胞に対して特定の生理活性作用を発現させる、天然由来の化合物を指す。該生理活性作用には、後述する、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などの生化学的変化が含まれる。

【0067】

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニング方法は、例えば、ウェストウェスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していると予想される細胞、組織、臓器よりcDNAを単離し、これをファージベクター、例えばλgt11、ZAPII等へ導入してcDNAライブラリーを作製し、これを培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本

発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

【0068】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いたtwo-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行う方法が挙げられる。

【0069】

本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料として所望のcDNAとヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードするDNAを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するようなtwo-ハイブリッドシステムを用いることができる。本発明の蛋白質に結合する蛋白質が存在した場合、レポーター遺伝子の発現量を検出又は測定することにより蛋白質を選択することができる。

【0070】

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNAとLexAのDNA結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致するように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望のcDNAとGAL4転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。

【0071】

LexA結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節されるHIS3遺伝子を組み込んだ細胞を上記のtwo-ハイブリッドシステム発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートすると蛋白質の相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。

【0072】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子等を用いることができる。

【0073】

two-ハイブリッドシステムは、通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販のtwo-ハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれもCLONTECH製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene製) が挙げられる。

【0074】

本発明におけるスクリーニング方法の他の態様は、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うことができる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。この場合の被験試料としては、細胞の培養上清、細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を得ることができる。

【0075】

また、本発明の蛋白質を適当な宿主細胞表面に安定的に発現せしめた後、リガンドを含むと考えられる試料を該細胞に接触せしめることにより、該細胞に誘起される生化学的変化を検出することによって、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニングを行うことも可能である。宿主細胞としては、種々の哺乳動物細胞を利用することが可能であるが、好ましくは本発明の蛋白質が本来発現している細胞、例えば、免疫細胞である。指標となる生化学的変化としては、本発明の蛋白質に結合するG蛋白質の種類により異なるが、例えば、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などが挙げられる。また、より一般的な指標として、マイクロフィジオメータ（例えば、モレキュラーデバイス社製「サイトセンサー^R」）を利用した微小細胞外pH変化を用いることも可能である。

【0076】

本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液、海洋生物抽出液、植物抽出液が挙げられる。

【0077】

上記のスクリーニング方法によって単離される化合物は、本発明の受容体蛋白質の機能異常などに起因する疾患において、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

【0078】

また、上述した生化学的変化を指標に、あるいは本発明の受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害する活性を指標に、該受容体蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニストをスクリーニングすることも可能である。本発明において「アゴニスト」とは、本発明の蛋白質に結合することにより、細胞に、リガンドと同様の生理活性作用を発現させる、非天然由来の化合物を指す。また、本発明において「アンタゴニスト」とは、本発明の蛋白質に対するリガンドやアゴニストの作用を阻害する化合物を指し、天然由来および非天然由来の化合物を含む。

【0079】

細胞内における生化学的変化を指標とした方法においては、例えば、上述した本発明の蛋白質を安定的に発現させた細胞に、リガンドの共存下で、被検試料を接触させ、上述した生化学的指標を測定する。その結果、該生化学的指標における、例えば、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などが阻害されれば、該被検試料に含まれる化合物は本発明の蛋白質のアンタゴニストであると判定される。

【0080】

また、例えば、上述した本発明の蛋白質を安定的に発現させた細胞に、直接、被検試料を接触させ、上述した生化学的変化を測定することによりアゴニストを

単離することもできる。

【0081】

また 本発明の受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害する活性を指標とした、アゴニストやアンタゴニストの単離は、例えば、ファージディスプレイ法を利用して行うことが可能である。この方法においては、例えば、文献 (Nicholas C. et al. Science, vol273, p458, 1996) に従い、pSKAN Phagemid Display System (カタログ番号OB-15 18-00) を用いればよい。

【0082】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

【0083】

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する物質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0084】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のような

なベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0085】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0086】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0087】

本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0088】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0089】

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

【0090】

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0091】

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

【0092】

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0093】

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

【0094】

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

【0095】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

【0096】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0097】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0098】

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

【0099】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

【0100】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0101】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0102】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0103】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0104】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0105】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K.

and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0106】

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

【0107】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0108】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【0109】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で用いられる抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使われている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 等により行うことができる。

【0110】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC 末端からなる断片あるいはN 末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製) を使用することができる。

【0111】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

【0112】

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

【0113】

本発明は、配列番号：1 から4 のいずれか一つに示される塩基配列からなるDNA または該DNA と相補的なDNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA を包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコード

するDNA又は該DNAと相補的なDNAと選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

【0114】

本発明は、例えば、配列番号：1から4のいずれか一つに示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1から4のいずれか一つに示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0115】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0116】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA 又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA 又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1から4に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

【0117】

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお

、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

【0118】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

【0119】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

【0120】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

【0121】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0122】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1～100mg/kg好ましくは0.1～50mg/kgの範囲で投与することができる。

【0123】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

【0124】

【実施例】

【実施例1】 Blast 検索

既知の Olfactory受容体(OR)遺伝子ファミリーを構造的に比較した場合、第2細胞膜貫通領域と第7細胞膜貫通領域をコードするアミノ酸配列において、高い相同性を認めることができる。そこで本発明者らは、この二つの領域のうち、第2細胞膜貫通領域の保存されたアミノ酸配列である [LHTPMYFFLSNLSF] 配列を質問式(query)として用い、GenBank の nr データベースに対しBlast 検索をおこなうことで、同遺伝子群に属する新規有用遺伝子配列の検索を試みた。検索条件としては、BLASTN(Ver.2.0.5)のデフォルト値(初期設定値)条件に従った。その結果、陽性対照として多くの既知OR遺伝子配列を検出した以外に、それら既知OR遺伝子配列と構造的に高い相同性を保有する、複数のヒトゲノム配列を見出した。これら遺伝子は、ヒト第11染色体に由来するBAC clone (GenBank Accession# AC002556)の配列内に認められ、既知のヒトOlfactory Receptor 1(OLF1)、OLF2、及びOLF3とアミノ酸翻訳レベルで約30%~40%の相同性を示した。後述する遺伝子発現様態の解析結果と機能予測結果から、見出した4つの遺伝子をそれぞれ「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 11-1」(GTAR11-1)、
「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 11-2」(GTAR11-2)、
「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 11-3」(GTAR11-3)、
「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 11-4」(GTAR11-4)と命名した。

【0125】

【実施例2】 ジェノミックPCR によるGTAR11遺伝子の単離

BAC clone AC002556の配列内において、既知OLFレセプターにアミノ酸翻訳レベルで、広く保存されているExon領域を予測し、その予測したExon領域の配列上

に以下のプライマーを合成した。

【0126】

GTAR11-1増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR11-1-S1「5'-GAA GAG CAG TGA GGG TCC ATG TTA AGG -3'／配列番号：9」、GTAR11-1-S2「5'-CAG CAG CTT GTC CTT CGT CGA TTT CTG C -3'／配列番号：10」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR11-1-A2「5'-GCT AGG GTG GGC ACC AAG G TG TTA AAC CC -3'／配列番号：11」、GTAR11-1-A3「5'-TGC AAA AGG ACA GTT TCA TCA TGG CAC -3'／配列番号：12」を用いた。

【0127】

また、GTAR11-2増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR11-2-S1「5'-CAA AGA ACT CAC CCA AAT TCC TAC AGC T -3'／配列番号：13」、GTAR11-2-S2「5'-CAT GGT AGG CAA CCT TGG CTT GAT CAC -3'／配列番号：14」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR11-2-A1「5'-GTT TAT TAA ATC A CA CAT AAC ACC ATC TG -3'／配列番号：15」、GTAR11-2-A2「5'-CAG AGA CAG AGC AAT GAC ATG AGA GCT AC -3'／配列番号：16」を用いた。

【0128】

また、GTAR11-3増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR11-3-S1「5'-CAA AGA ACT CAC CCA AAT TCC TAC AGC C -3'／配列番号：17」、GTAR11-3-S2「5'-CAT GGT AGG CAA CCT TGG CTT GAT CAT -3'／配列番号：18」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR11-3-A1「5'-GTT TAT TAA ATC A CA CAT AAC ACC ATC TG -3'／配列番号：19」、GTAR11-3-A2「5'-CAG AGA CAG AGC AAT GAC ATG AGA GCT AC -3'／配列番号：20」を用いた。

【0129】

また、GTAR11-4増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR11-4-S1「5'-CCA GAC AGC TCG CCA AGA GAG AAT GAC -3'／配列番号：21」、GTAR11-4-S2「5'-CCT TTA TAG ATC TCT GTT ATT CCT GTG TG -3'／配列番号：22」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR11-4-A1「5'-TCG GTT GCC AGT G AT ATG AAG AGA CCC -3'／配列番号：23」、GTAR11-4-A2「5'-GGC TTT GGA TC T GCC CTC TGC AGA AGG -3'／配列番号：24」を用いた。

【0130】

Human Genomic DNA (Clontech#6550-1) を鋳型として用い、GTAR11-1増幅のために「11-1-S1および11-1-A2」、「11-1-S1および11-1-A3」、「11-1-S2および11-1-A2」、「11-1-S2および11-1-A3」の各組合わせ、GTAR11-2増幅のために「11-2-S1および11-2-A1」、「11-2-S1および11-2-A2」、「11-2-S2および11-2-A1」、「11-2-S2および11-2-A2」の各組合わせ、GTAR11-3増幅のために「11-3-S1および11-3-A1」、「11-3-S1および11-3-A2」、「11-3-S2および11-3-A1」、「11-3-S2および11-3-A2」の各組合わせ、GTAR11-4増幅のために「11-4-S1および11-4-A1」、「11-4-S1および11-4-A2」、「11-4-S2および11-4-A1」、「11-4-S2および11-4-A2」の各組合わせによるジェノミックPCRを試みた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。PCRの条件は、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を28サイクル、72℃で4分、および4℃で終結で行った。その結果、それぞれのプライマーでの組合わせにおいて、予想されるサイズに単一のバンドが検出された。

【0131】

得られたジェノミック PCR 産物を、pGEM-T Easy vector (Promega#A1360) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR 産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA リガーゼ (Promega#A1360) によって、4℃で12時間の反応をおこなった。PCR 産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5α (Toyobo#DNA-903) を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/Perkin Elmer#4303141)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。

【0132】

ここで標的遺伝子断片のORF内に位置するプライマーどうしの組合わせによるジェノミックPCR 産物、即ち、GTAR11-1遺伝子の増幅においては11-1-S2および1

11-1-A3のプライマーセットを用いた増幅産物、GTAR11-2遺伝子の増幅においては11-2-S2および11-2-A2のプライマーセット、GTAR11-3遺伝子の増幅においては11-3-S2および11-3-A2のプライマーセット、GTAR11-4遺伝子の増幅においては11-4-S2および11-4-A2のプライマーセットを用いた増幅産物より、それぞれ独立する10クローンの遺伝子組換え体を選別し、全インサート断片の塩基配列を決定した。

【0133】

その結果、GTAR11-1遺伝子の増幅においては全クローンともに450 bpの単一な塩基配列を示した。また、GTAR11-2遺伝子およびGTAR11-3遺伝子の増幅においては全クローンともに637 bpの単一な塩基配列を示した。また、GTAR11-4遺伝子の増幅においては全クローンともに509 bpの単一な塩基配列を示した。これらの得られた配列が、それぞれの遺伝子の部分塩基配列であることを確認し、非特異的なジェノミックPCR増幅でないことを確認した。これにより、実施例3に記載のRT-PCRにおいても、これらプライマーセットが正しく作用できるであろうことが期待された。ジェノミックPCRにより得られたGTAR11-1、GTAR11-2、GTAR11-3、およびGTAR11-4の部分塩基配列をそれぞれ図1, 2, 3, 4および配列番号: 25, 26, 27, 28に示す。

【0134】

【実施例3】 RT-PCRによるGTAR11遺伝子の発現組織の検索と発現様態の解析
各ヒト臓器におけるGTAR11遺伝子の発現分布、及び遺伝子発現様態を解析するために、GTAR11-1遺伝子、GTAR11-2遺伝子、GTAR11-3遺伝子、GTAR11-4遺伝子の増幅においては、それぞれ「11-1-S2および11-1-A2」の組合わせ、「11-2-S2および11-2-A2」の組合わせ、「11-3-S2および11-3-A2」の組合わせ、「11-4-S2および11-4-A2」の組合わせによる、RT-PCRを行った。

【0135】

鋳型として、Human Fetal Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech#K1425-1)、Human Multiple Tissue cDNA Panel I (Clontech#K1420-1) 及び、Human Multiple Tissue cDNA Panel II (Clontech#K1421-1)を用いた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Am

p PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。PCRの条件は、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を38サイクル、72℃で4分、および4℃で終結で行った。

【0136】

この結果、ヒト胎児臓器由来のGTAR11-1 mRNA においては、胎児脾臓で強いPCR産物の増幅が認められた他、胎児脳、胎児肺、胎児平滑筋においても弱い遺伝子発現が検出された。成人臓器由来のmRNA においては、胸腺、脾臓、末梢リンパ球といったリンパ造血系、小腸、結腸などの消化管、及び生殖器系や神経系、内分泌系などにおいて幅広い遺伝子発現が検出された(図5)。

【0137】

ヒト胎児臓器由来のGTAR11-2 mRNA においては、胎児胸腺で強いPCR産物の増幅が認められた他、胎児脾臓、胎児平滑筋、胎児肺、胎児腎臓でも弱い遺伝子発現が認められた。成人臓器由来のmRNA においては、胸腺、末梢リンパ球といったリンパ造血系以外に、消化管、及び生殖器系や神経系、内分泌系などにおいても幅広く検出された(図6)。

【0138】

ヒト胎児臓器由来のGTAR11-3 mRNA においては、胎児平滑筋で強いPCR産物の増幅が認められた他、胎児脳、胎児肺、胎児肝臓においても弱い遺伝子発現が検出された。成人臓器由来のmRNA においては、胸腺、脾臓、末梢リンパ球といったリンパ造血系、小腸、結腸などの消化管や筋肉、及び生殖器系や神経系、内分泌系などにおいて幅広い遺伝子発現が検出された(図7)。

【0139】

ヒト胎児臓器由来のGTAR11-4 mRNA においては、胎児平滑筋でのみ強いPCR産物の増幅が認められ、成人臓器由来のmRNA においては、胸腺、脾臓、末梢リンパ球といったリンパ造血系、小腸、結腸などの消化管、及び生殖器系や内分泌系、筋肉などにおいて幅広い遺伝子発現分布が認められた(図8)。

【0140】

得られたそれぞれのPCR産物を、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360)

にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR 産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase(Promega#A1360) によって、4℃で12時間の反応をおこなった。PCR 産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 α (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/Perkin Elmer#4303141)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。それぞれ独立する10クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、全クローンともに単一の塩基配列を示した。

【0141】

得られた配列が、それぞれGTAR11-1、GTAR11-2、GTAR11-3、GTAR11-4の部分塩基配列である事を確認し、非特異的なRT-PCR増幅でないことを確認した。

【0142】

【実施例4】 5' -及び3' -RACE法による完全長cDNAクローニング

(1) 5' -RACE法

GTAR11の全長 cDNA を単離するために、5' RACE-PCRを試みた。GTAR11-1遺伝子、GTAR11-2遺伝子、GTAR11-3遺伝子、およびGTAR11-4遺伝子の増幅のために、一次PCRには、それぞれ11-1-A2、11-2-A1、11-3-A1、11-4-A1を、二次PCRにはそれぞれ11-1-A3、11-2-A2、11-3-A2、11-4-A2をプライマーとして用いた。

【0143】

鋳型としてHuman Testis Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7414-1)

を用い、PCR 実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR 条件で行った結果、単一のサイズを示すPCR産物が得られた。

【0144】

一次PCRは、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を30サイクル、72℃で4分、および4℃で終結の条件で行った。二次PCRは、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を28サイクル、72℃

で4分、および4℃で終結の条件で行った。

【0145】

得られた5' RACE-PCR 産物は、前記同様、pGEM-T Easy vector にサブクロニングし、独立する6クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。

【0146】

(2) 3' -RACE法

GTAR11の全長 cDNA を単離するために、3' RACE-PCRを試みた。GTAR11-1遺伝子、GTAR11-2遺伝子、GTAR11-3遺伝子、およびGTAR11-4遺伝子の増幅のために、一次PCRには、それぞれ11-1-S1、11-2-S1、11-3-S1、11-4-S1を、二次PCRにはそれぞれ11-1-S2、11-2-S2、11-3-S2、11-4-S2をプライマーとして用いた。

【0147】

鋳型として5' RACE-PCR同様、Human Testis Marathon-Ready cDNA Libraryを用い、PCR 実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。PCR 条件は前記5' RACE-PCR同様の条件で行った結果、単一なサイズを示すPCR産物のバンドが得られた。それぞれの遺伝子に関し、得られたPCR 産物を、前記同様、pGEM-T Easy vectorにサブクロニングし、独立する6クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。この結果、それぞれの遺伝子に関し、独立した全6クローンともに単一の塩基配列を示した。この3' RACE-PCRの結果、決定した塩基配列と、前述の5' RACE-PCRの結果により決定した塩基配列とを総合することによって、より長いGTAR11 cDNAの塩基配列を決定した。決定したcDNAの塩基配列を、図9 (GTAR11-1)、図10 (GTAR11-2)、図11 (GTAR11-3)、図12 (GTAR11-4)、並びに配列番号:1 (GTAR11-1)、配列番号:2 (GTAR11-2)、配列番号:3 (GTAR11-3)、配列番号:4 (GTAR11-4) に示した。

【0148】

既知OR遺伝子群のゲノム構造は、それらをコードするゲノム配列の1つのexon配列内に、開始コドンから終始コドンまでのORFを含んでいる特徴を持つ。全長cDNAが単離されたGTAR11-2、GTAR11-3、およびGTAR11-4も同様に、1つのexonと考えられる配列内にORFの全長を認めることができた。

【0149】

図13に既知のヒトOLF1、OLF2、及びOLF3と、GTAR11-1のアミノ酸配列を比較して記載する。図14に既知のヒトOLF2、及びOLF3と、GTAR11-2のアミノ酸配列を比較して記載する。図15に既知のヒトOLF2、及びOLF3と、GTAR11-3のアミノ酸配列を比較して記載する。図16に既知のヒトOLF2及び、OLF3と、GTAR11-4のアミノ酸配列を比較して記載する。

【0150】

【発明の効果】

本発明により新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子が提供された。本発明の受容体蛋白質は、その発現特性などから免疫応答や造血などに関与していることが予想されるため、これら蛋白質を利用して、免疫応答や造血細胞制御のための薬剤を開発するためのスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。また、本発明の受容体蛋白質を利用して、免疫応答や造血などに関連して本発明の受容体蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングを行うことも可能であると考えられる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

<130> C2-012

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (17)..(760)

<400> 1

aaatgcctaa agaaga atg acc atg gaa aat tat tct atg gca gct cag ttt 52

Met Thr Met Glu Asn Tyr Ser Met Ala Ala Gln Phe

1

5

10

gtc tta gat ggt tta aca cag caa gca gag ctc cag ctg ccc ctc ttc 100

Val Leu Asp Gly Leu Thr Gln Gln Ala Glu Leu Gln Leu Pro Leu Phe

15

20

25

ctc ctg ttc ctg gga atc tat gtg gtc aca gta gtg ggc aac ctg ggc 148

Leu Leu Phe Leu Gly Ile Tyr Val Val Thr Val Val Gly Asn Leu Gly

30

35

40

atg att ctc ctg att gca gtc agc cct cta ctt cac acc ccc atg tac 196

Met Ile Leu Leu Ile Ala Val Ser Pro Leu Leu His Thr Pro Met Tyr

45 50 55 60

tat ttc ctc agc agc ttg tcc ttc gtc gat ttc tgc tat tcc tct gtc 244

Tyr Phe Leu Ser Ser Leu Ser Phe Val Asp Phe Cys Tyr Ser Ser Val

65 70 75

att act ccc aaa atg ctg gtg aac ttc cta gga aag aag aat aca atc 292

Ile Thr Pro Lys Met Leu Val Asn Phe Leu Gly Lys Lys Asn Thr Ile

80 85 90

ctt tac tct gag tgc atg gtc cag ctc ttt ttc ttt gtg gtc ttt gtg 340

Leu Tyr Ser Glu Cys Met Val Gln Leu Phe Phe Phe Val Val Phe Val

95 100 105

gtg gct gag ggt tac ctc ctg act gcc atg gca tat gat cgc tat gtt 388

Val Ala Glu Gly Tyr Leu Leu Thr Ala Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val

110 115 120

gcc atc tgt agc cca ctg ctt tat aat gcg atc atg tcc tca tgg gtc 436

Ala Ile Cys Ser Pro Leu Leu Tyr Asn Ala Ile Met Ser Ser Trp Val

125 130 135 140

tgc tca ctg cta gtg ctg gct gcc ttc ttc ttg ggc ttt ctc tct gcc 484

Cys Ser Leu Leu Val Leu Ala Ala Phe Phe Leu Gly Phe Leu Ser Ala

145 150 155

ttg act cat aca agt gcc atg atg aaa ctg tcc ttt tgc aaa tcc cac 532
 Leu Thr His Thr Ser Ala Met Met Lys Leu Ser Phe Cys Lys Ser His
 160 165 170

att atc aac cat tac ttc tgt gat gtt ctt ccc ctc ctc aat ctc tcc 580
 Ile Ile Asn His Tyr Phe Cys Asp Val Leu Pro Leu Leu Asn Leu Ser
 175 180 185

tgc tcc aac aca cac ctc aat gag ctt cta ctt ttt atc att gcg ggg 628
 Cys Ser Asn Thr His Leu Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Ile Ala Gly
 190 195 200

ttt aac acc ttg gtg ccc acc cta gct gtt gct gtc tcc tat gcc ttc 676
 Phe Asn Thr Leu Val Pro Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Tyr Ala Phe
 205 210 215 220

atc ctc tac agc atc ctt cac atc cgc tcc tca gag ggc cgg tcc aaa 724
 Ile Leu Tyr Ser Ile Leu His Ile Arg Ser Ser Glu Gly Arg Ser Lys
 225 230 235

gct ttt gga aca tgc agc tct cat ctc atg gct gtg gt 762
 Ala Phe Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Met Ala Val
 240 245

<210> 2

<211> 1069

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(956)

<400> 2

atttttgaag acaaaaa atg ctg gct aga aac aac tcc tta gtg act gaa 50

Met Leu Ala Arg Asn Asn Ser Leu Val Thr Glu

1 5 10

ttt att ctt gct gga tta aca gat cgt cca gag ttc tgg caa ccc ttc 98

Phe Ile Leu Ala Gly Leu Thr Asp Arg Pro Glu Phe Trp Gln Pro Phe

15 20 25

ttt ttc ctg ttc cta gtg atc tac att gtc acc atg gta ggc aac ctt 146

Phe Phe Leu Phe Leu Val Ile Tyr Ile Val Thr Met Val Gly Asn Leu

30 35 40

ggc ttg atc act ctt ttc ggt cta aat tct cac ctc cac aca cca atg 194

Gly Leu Ile Thr Leu Phe Gly Leu Asn Ser His Leu His Thr Pro Met

45 50 55

tac tat ttc ctc ttc aat ctc tcc ttc att gat ctc tgt tac tcc tct 242

Tyr Tyr Phe Leu Phe Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Ser

60 65 70 75

gtt ttc act ccc aaa atg cta atg aac ttt gtg tca aaa aag aat att 290

Val Phe Thr Pro Lys Met Leu Met Asn Phe Val Ser Lys Lys Asn Ile

80 85 90

atc tcc aat gtt ggg tgc atg act cgg ctg ttt ttc ttt ctc ttt ttc 338

Ile Ser Asn Val Gly Cys Met Thr Arg Leu Phe Phe Phe Leu Phe Phe

95

100

105

gtc atc tct gaa tgt tac atg ttg acc tca atg gca tat gat cgc tat 386

Val Ile Ser Glu Cys Tyr Met Leu Thr Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr

110

115

120

gtg gcc atc tgt aat cca ttg ctg tat aag gtc acc atg tcc cat cag 434

Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu Leu Tyr Lys Val Thr Met Ser His Gln

125

130

135

gtc tgt tct atg ctc act ttt gct gct tac ata atg gga ttg gct gga 482

Val Cys Ser Met Leu Thr Phe Ala Ala Tyr Ile Met Gly Leu Ala Gly

140

145

150

155

gcc acg gcc cac acc ggg tgc atg ttt aga ctc acc ttc tgc agt gct 530

Ala Thr Ala His Thr Gly Cys Met Phe Arg Leu Thr Phe Cys Ser Ala

160

165

170

aat atc att aac cat tac ttg tgt gac ata ctc ccc ctc ctc cag ctt 578

Asn Ile Ile Asn His Tyr Leu Cys Asp Ile Leu Pro Leu Leu Gln Leu

175

180

185

tcc tgc acc agc acc tat gtc aac gag gtg gtt gtt ctc att gtt gtg 626

Ser Cys Thr Ser Thr Tyr Val Asn Glu Val Val Val Leu Ile Val Val

190

195

200

ggt act aat atc acg gta ccc agt tgt acc atc ctc att tct tat gtt 674

Gly Thr Asn Ile Thr Val Pro Ser Cys Thr Ile Leu Ile Ser Tyr Val

205

210

215

ttc att gtc act agc att ctt cat atc aaa tcc act caa gga aga tca 722

Phe Ile Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Ser Thr Gln Gly Arg Ser

220

225

230

235

aaa gcc ttc agt act tgt agc tct cat gtc att gct ctg tct ctg ttt 770

Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser Ser His Val Ile Ala Leu Ser Leu Phe

240

245

250

ttt ggg tca gcg gca ttc atg tat att aaa tat tct tct gga tct atg 818

Phe Gly Ser Ala Ala Phe Met Tyr Ile Lys Tyr Ser Ser Gly Ser Met

255

260

265

gag cag gga aaa gtt ttt tct gtt ttc tac act aat gtg gtg ccc atg 866

Glu Gln Gly Lys Val Phe Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met

270

275

280

ctc aat ccc ctc atc tac agt ttg agg aac aag gat gtc aaa gtt gca 914

Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Lys Val Ala

285

290

295

ctg agg aaa gct ctg att aaa att cag agg aga aat ata ttc 956

Leu Arg Lys Ala Leu Ile Lys Ile Gln Arg Arg Asn Ile Phe

300

305

310

taattagaag cagtaatgat gtaaaacaat tgaaggactt caaatTTTTT ttagtGTTTT 1016

tcatgaagag attttgttgt ttctacagat ggtgttatgt gtgatttaaat aaa 1069

<210> 3

<211> 1069

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(956)

<400> 3

atttttgaag acaaaaa atg ctg gct aga aac aac tcc tta gtg act gaa 50

Met Leu Ala Arg Asn Asn Ser Leu Val Thr Glu

1

5

10

ttt att ctt gct gga tta aca gat cgt cca gag ttc cgg caa ccc ctc 98

Phe Ile Leu Ala Gly Leu Thr Asp Arg Pro Glu Phe Arg Gln Pro Leu

15

20

25

ttt ttc ctg ttt cta gtg atc tac att gtc acc atg gta ggc aac ctt 146

Phe Phe Leu Phe Leu Val Ile Tyr Ile Val Thr Met Val Gly Asn Leu

30

35

40

ggc ttg atc att ctt ttc ggt cta aat tct cac ctc cac aca cca atg 194

Gly Leu Ile Ile Leu Phe Gly Leu Asn Ser His Leu His Thr Pro Met

45

50

55

tac tat ttc ctc ttc aat ctc tcc ttc att gat ctc tgt tac tcc tct 242
 Tyr Tyr Phe Leu Phe Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Ser
 60 65 70 75

gtt ttc act ccc aaa atg cta atg aac ttt gta tca aaa aag aat att 290
 Val Phe Thr Pro Lys Met Leu Met Asn Phe Val Ser Lys Lys Asn Ile
 80 85 90

atc tcc tat gtt ggg tgc atg act cag ctg ttt ttc ttt ctc ttt ttt 338
 Ile Ser Tyr Val Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Phe Leu Phe Phe
 95 100 105

gtc atc tct gaa tgc tac ata ttg acc tca atg gca tat gat cgc tat 386
 Val Ile Ser Glu Cys Tyr Ile Leu Thr Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr
 110 115 120

gtg gcc atc tgt aat cca ttg ctg tat aag gtc acc atg tcc cat cag 434
 Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu Leu Tyr Lys Val Thr Met Ser His Gln
 125 130 135

gtc tgt tct atg ctc act ttt gct gct tac ata atg gga ttg gct gga 482
 Val Cys Ser Met Leu Thr Phe Ala Ala Tyr Ile Met Gly Leu Ala Gly
 140 145 150 155

gcc acg gcc cac acc ggg tgc atg ctt aga ctc acc ttc tgc agt gct 530
 Ala Thr Ala His Thr Gly Cys Met Leu Arg Leu Thr Phe Cys Ser Ala
 160 165 170

aat atc atc aac cat tac ttg tgt gac ata ctc ccc ctc ctc cag ctt 578

Asn Ile Ile Asn His Tyr Leu Cys Asp Ile Leu Pro Leu Leu Gln Leu

175

180

185

tcc tgc acc agc acc tat gtc aac gag gtg gtt gtt ctc att gtt gtg 626

Ser Cys Thr Ser Thr Tyr Val Asn Glu Val Val Val Leu Ile Val Val

190

195

200

ggc att aat atc atg gta ccc agt tgt acc atc ctc att tct tat gtt 674

Gly Ile Asn Ile Met Val Pro Ser Cys Thr Ile Leu Ile Ser Tyr Val

205

210

215

ttc att gtc act agc att ctt cat atc aaa tcc act caa gga aga tca 722

Phe Ile Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Ser Thr Gln Gly Arg Ser

220

225

230

235

aaa gcc ttc agt act tgt agc tct cat gtc att gct ctg tct ctg ttt 770

Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser Ser His Val Ile Ala Leu Ser Leu Phe

240

245

250

ttt ggg tca gcg gca ttc atg tat att aaa tat tct tct gga tct atg 818

Phe Gly Ser Ala Ala Phe Met Tyr Ile Lys Tyr Ser Ser Gly Ser Met

255

260

265

gag cag gga aaa gtt tct tct gtt ttc tac act aat gtg gtg ccc atg 866

Glu Gln Gly Lys Val Ser Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met

270

275

280

ctc aat cct ctc atc tac agt ttg agg aac aag gat gtc aaa gtt gca 914

Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Lys Val Ala
 285 290 295

ctg agg aaa gct ctg att aaa att cag aga aga aat ata ttc 956
 Leu Arg Lys Ala Leu Ile Lys Ile Gln Arg Arg Asn Ile Phe
 300 305 310

taattagaag cagtaataat gtaaaacgat tgaagaactt taaattttta ttagtgtgtt 1016

ccatgaagag attttgttgt ttctacagat ggtgttatgt gtgatttaaat aaa 1069

<210> 4

<211> 976

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (19)..(945)

<400> 4

acagctcgcc aagagaga atg act ctg aga aac agc tcc tca gtg act gag 51
 Met Thr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Val Thr Glu
 1 5 10

ttt atc ctt gtg gga tta tca gaa cag cca gag ctc cag ctc cct ctt 99
 Phe Ile Leu Val Gly Leu Ser Glu Gln Pro Glu Leu Gln Leu Pro Leu
 15 20 25

ttc ctt cta ttc tta ggg atc tat gtg ttc act gtg gtg ggc aac ttg 147

Phe Leu Leu Phe Leu Gly Ile Tyr Val Phe Thr Val Val Gly Asn Leu

30

35

40

ggc ttg atc acc tta att ggg ata aat cct agc ctt cac acc ccc atg 195

Gly Leu Ile Thr Leu Ile Gly Ile Asn Pro Ser Leu His Thr Pro Met

45

50

55

tac ttt ttc ctc ttc aac ttg tcc ttt ata gat ctc tgt tat tcc tgt 243

Tyr Phe Phe Leu Phe Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Cys

60

65

70

75

gtg ttt acc ccc aaa atg ctg aat gac ttt gtt tca gaa agt atc atc 291

Val Phe Thr Pro Lys Met Leu Asn Asp Phe Val Ser Glu Ser Ile Ile

80

85

90

tct tat gtg gga tgt atg act cag cta ttt ttc ttc tgt ttc ttt gtc 339

Ser Tyr Val Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Phe Cys Phe Phe Val

95

100

105

aat tct gag tgc tat gtg ttg gta tca atg gcc tat gat cgc tat gtg 387

Asn Ser Glu Cys Tyr Val Leu Val Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val

110

115

120

gcc atc tgc aac ccc ctg ctc tac atg gtc acc atg tcc cca agg gtc 435

Ala Ile Cys Asn Pro Leu Leu Tyr Met Val Thr Met Ser Pro Arg Val

125

130

135

tgc ttt ctg ctg atg ttt ggt tcc tat gtg gta ggg ttt gct ggg gcc 483

Cys Phe Leu Leu Met Phe Gly Ser Tyr Val Val Gly Phe Ala Gly Ala

140 145 150 155

atg gcc cac act gga agc atg ctg cga ctg acc ttc tgt gat tcc aac 531

Met Ala His Thr Gly Ser Met Leu Arg Leu Thr Phe Cys Asp Ser Asn

160 165 170

gtc att gac cat tat ctg tgt gac gtt ctc ccc ctc ttg cag ctc tcc 579

Val Ile Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Leu Pro Leu Leu Gln Leu Ser

175 180 185

tgc acc agc acc cat gtc agt gag ctg gta ttt ttc att gtt gtt gga 627

Cys Thr Ser Thr His Val Ser Glu Leu Val Phe Phe Ile Val Val Gly

190 195 200

gta atc acc atg cta tcc agc ata agc atc gtc atc tct tac gct ttg 675

Val Ile Thr Met Leu Ser Ser Ile Ser Ile Val Ile Ser Tyr Ala Leu

205 210 215

ata ctc tcc aac atc ctc tgt att cct tct gca gag ggc aga tcc aaa 723

Ile Leu Ser Asn Ile Leu Cys Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Ser Lys

220 225 230 235

gcc ttt agc aca tgg ggc tcc cac ata att gct gtt gct ctg ttt ttt 771

Ala Phe Ser Thr Trp Gly Ser His Ile Ile Ala Val Ala Leu Phe Phe

240 245 250

ggg tca ggg aca ttc acc tac tta aca aca tct ttt cct ggc tct atg 819

Gly Ser Gly Thr Phe Thr Tyr Leu Thr Thr Ser Phe Pro Gly Ser Met

255

260

265

aac cat ggc aga ttt gcc tca gtc ttt tac acc aat gtg gtt ccc atg 867

Asn His Gly Arg Phe Ala Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met

270

275

280

ctt aac cct tcg atc tac agt ttg agg aat aag gat gat aaa ctt gcc 915

Leu Asn Pro Ser Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Asp Lys Leu Ala

285

290

295

ctg ggc aaa acc ctg aag aga gtg ctc ttc taatgggtct cttcatatca 965

Leu Gly Lys Thr Leu Lys Arg Val Leu Phe

300

305

ctggcaaccg a

976

<210> 5

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Met Glu Asn Tyr Ser Met Ala Ala Gln Phe Val Leu Asp Gly

1

5

10

15

Leu Thr Gln Gln Ala Glu Leu Gln Leu Pro Leu Phe Leu Leu Phe Leu

20

25

30

Gly Ile Tyr Val Val Thr Val Val Gly Asn Leu Gly Met Ile Leu Leu

35

40

45

Ile Ala Val Ser Pro Leu Leu His Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Ser

50

55

60

Ser Leu Ser Phe Val Asp Phe Cys Tyr Ser Ser Val Ile Thr Pro Lys

65

70

75

80

Met Leu Val Asn Phe Leu Gly Lys Lys Asn Thr Ile Leu Tyr Ser Glu

85

90

95

Cys Met Val Gln Leu Phe Phe Phe Val Val Phe Val Val Ala Glu Gly

100

105

110

Tyr Leu Leu Thr Ala Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Ser

115

120

125

Pro Leu Leu Tyr Asn Ala Ile Met Ser Ser Trp Val Cys Ser Leu Leu

130

135

140

Val Leu Ala Ala Phe Phe Leu Gly Phe Leu Ser Ala Leu Thr His Thr

145

150

155

160

Ser Ala Met Met Lys Leu Ser Phe Cys Lys Ser His Ile Ile Asn His

165

170

175

Tyr Phe Cys Asp Val Leu Pro Leu Leu Asn Leu Ser Cys Ser Asn Thr

180

185

190

His Leu Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Ile Ala Gly Phe Asn Thr Leu

195

200

205

Val Pro Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Tyr Ala Phe Ile Leu Tyr Ser

210

215

220

Ile Leu His Ile Arg Ser Ser Glu Gly Arg Ser Lys Ala Phe Gly Thr

225

230

235

240

Cys Ser Ser His Leu Met Ala Val

245

<210> 6

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Ala Arg Asn Asn Ser Leu Val Thr Glu Phe Ile Leu Ala Gly

1

5

10

15

Leu Thr Asp Arg Pro Glu Phe Trp Gln Pro Phe Phe Phe Leu Phe Leu

20

25

30

Val Ile Tyr Ile Val Thr Met Val Gly Asn Leu Gly Leu Ile Thr Leu

35

40

45

Phe Gly Leu Asn Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Phe

50

55

60

Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Ser Val Phe Thr Pro Lys

65

70

75

80

Met Leu Met Asn Phe Val Ser Lys Lys Asn Ile Ile Ser Asn Val Gly

85

90

95

Cys Met Thr Arg Leu Phe Phe Phe Leu Phe Phe Val Ile Ser Glu Cys

100

105

110

Tyr Met Leu Thr Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn

115

120

125

Pro Leu Leu Tyr Lys Val Thr Met Ser His Gln Val Cys Ser Met Leu

130

135

140

Thr Phe Ala Ala Tyr Ile Met Gly Leu Ala Gly Ala Thr Ala His Thr

145

150

155

160

Gly Cys Met Phe Arg Leu Thr Phe Cys Ser Ala Asn Ile Ile Asn His

165

170

175

Tyr Leu Cys Asp Ile Leu Pro Leu Leu Gln Leu Ser Cys Thr Ser Thr

180

185

190

Tyr Val Asn Glu Val Val Val Leu Ile Val Val Gly Thr Asn Ile Thr

195

200

205

Val Pro Ser Cys Thr Ile Leu Ile Ser Tyr Val Phe Ile Val Thr Ser

210

215

220

Ile Leu His Ile Lys Ser Thr Gln Gly Arg Ser Lys Ala Phe Ser Thr

225

230

235

240

Cys Ser Ser His Val Ile Ala Leu Ser Leu Phe Phe Gly Ser Ala Ala

245

250

255

Phe Met Tyr Ile Lys Tyr Ser Ser Gly Ser Met Glu Gln Gly Lys Val

260

265

270

Phe Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile

275

280

285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Lys Val Ala Leu Arg Lys Ala Leu

290

295

300

Ile Lys Ile Gln Arg Arg Asn Ile Phe

305

310

<210> 7

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Ala Arg Asn Asn Ser Leu Val Thr Glu Phe Ile Leu Ala Gly

1 5 10 15

Leu Thr Asp Arg Pro Glu Phe Arg Gln Pro Leu Phe Phe Leu Phe Leu

20 25 30

Val Ile Tyr Ile Val Thr Met Val Gly Asn Leu Gly Leu Ile Ile Leu

35 40 45

Phe Gly Leu Asn Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Phe

50 55 60

Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Ser Val Phe Thr Pro Lys

65 70 75 80

Met Leu Met Asn Phe Val Ser Lys Lys Asn Ile Ile Ser Tyr Val Gly

85 90 95

Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Phe Leu Phe Phe Val Ile Ser Glu Cys

100 105 110

Tyr Ile Leu Thr Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn

115 120 125

Pro Leu Leu Tyr Lys Val Thr Met Ser His Gln Val Cys Ser Met Leu

130 135 140

Thr Phe Ala Ala Tyr Ile Met Gly Leu Ala Gly Ala Thr Ala His Thr

145 150 155 160

Gly Cys Met Leu Arg Leu Thr Phe Cys Ser Ala Asn Ile Ile Asn His

165 170 175

Tyr Leu Cys Asp Ile Leu Pro Leu Leu Gln Leu Ser Cys Thr Ser Thr

180 185 190

Tyr Val Asn Glu Val Val Val Leu Ile Val Val Gly Ile Asn Ile Met

195 200 205

Val Pro Ser Cys Thr Ile Leu Ile Ser Tyr Val Phe Ile Val Thr Ser

210 215 220

Ile Leu His Ile Lys Ser Thr Gln Gly Arg Ser Lys Ala Phe Ser Thr

225 230 235 240

Cys Ser Ser His Val Ile Ala Leu Ser Leu Phe Phe Gly Ser Ala Ala

245 250 255

Phe Met Tyr Ile Lys Tyr Ser Ser Gly Ser Met Glu Gln Gly Lys Val

260 265 270

Ser Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile

275 280 285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Lys Val Ala Leu Arg Lys Ala Leu

290 295 300

Ile Lys Ile Gln Arg Arg Asn Ile Phe

305

310

<210> 8

<211> 309

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Thr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Val Thr Glu Phe Ile Leu Val Gly

1

5

10

15

Leu Ser Glu Gln Pro Glu Leu Gln Leu Pro Leu Phe Leu Leu Phe Leu

20

25

30

Gly Ile Tyr Val Phe Thr Val Val Gly Asn Leu Gly Leu Ile Thr Leu

35

40

45

Ile Gly Ile Asn Pro Ser Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Phe

50

55

60

Asn Leu Ser Phe Ile Asp Leu Cys Tyr Ser Cys Val Phe Thr Pro Lys

65

70

75

80

Met Leu Asn Asp Phe Val Ser Glu Ser Ile Ile Ser Tyr Val Gly Cys

85

90

95

Met Thr Gln Leu Phe Phe Phe Cys Phe Phe Val Asn Ser Glu Cys Tyr

100	105	110
Val Leu Val Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro		
115	120	125
Leu Leu Tyr Met Val Thr Met Ser Pro Arg Val Cys Phe Leu Leu Met		
130	135	140
Phe Gly Ser Tyr Val Val Gly Phe Ala Gly Ala Met Ala His Thr Gly		
145	150	155
		160
Ser Met Leu Arg Leu Thr Phe Cys Asp Ser Asn Val Ile Asp His Tyr		
165	170	175
Leu Cys Asp Val Leu Pro Leu Leu Gln Leu Ser Cys Thr Ser Thr His		
180	185	190
Val Ser Glu Leu Val Phe Phe Ile Val Val Gly Val Ile Thr Met Leu		
195	200	205
Ser Ser Ile Ser Ile Val Ile Ser Tyr Ala Leu Ile Leu Ser Asn Ile		
210	215	220
Leu Cys Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Ser Lys Ala Phe Ser Thr Trp		
225	230	235
		240
Gly Ser His Ile Ile Ala Val Ala Leu Phe Phe Gly Ser Gly Thr Phe		
245	250	255

Thr Tyr Leu Thr Thr Ser Phe Pro Gly Ser Met Asn His Gly Arg Phe
260 265 270

Ala Ser Val Phe Tyr Thr Asn Val Val Pro Met Leu Asn Pro Ser Ile
275 280 285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Asp Lys Leu Ala Leu Gly Lys Thr Leu
290 295 300

Lys Arg Val Leu Phe
305

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

gaagagcagt gaggtccat gttaagg

27

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

cagcagcttg tccttcgtcg atttctgc

28

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

gctagggtgg gcaccaaggt gttaaacc

29

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

tgcaaaagga cagtttcac atggcac

27

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

caaagaactc acccaaattc ctacagct

28

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

catggtaggc aaccttggct tgatcac

27

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gtttattaaa tcacacataa caccatctg

29

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

cagagacaga gcaatgacat gagagctac

29

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

caaagaactc acccaaattc ctacagcc

28

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

catggtaggc aaccttggtc tgatcat

27

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

gtttattaaa tcacacataa caccatctg

29

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

cagagacaga gcaatgacat gagagctac

29

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

ccagacagct cgccaagaga gaatgac

27

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

cctttataga tctctgttat tcctgtgtg

29

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

tcggttgcca gtgatatgaa gagaccc

27

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

ggctttggat ctgccctctg cagaagg

27

<210> 25

<211> 450

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

cagcagcttg tccttcgtcg atttctgcta ttccctctgtc attactccca aaatgctggt 60

gaacttccta ggaaagaaga atacaatcct ttactctgag tgcattgtcc agctcttttt 120

ctttgtggtc tttgtggtgg ctgagggtta cctccigact gccatggcat atgatcgcta 180

tggtgccatc tgtagcccac tgctttataa tgcgatcatg tcctcatggg tctgctcact 240
 gctagtgctg gctgccttct tcttgggctt tctctctgcc ttgactcata caagtgccat 300
 gatgaaactg tccttttgca aatcccacat tatcaaccat tacttctgtg atgttcttcc 360
 cctcctcaat ctctcctgct ccaacacaca cctcaatgag cttctacttt ttatcattgc 420
 ggggtttaac accttgggtgc ccaccctagc 450

<210> 26

<211> 637

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

catggtaggc aaccttggct tgatcactct tticgggtcta aattctcacc tccacacacc 60

aatgtactat ttctcttca atctctcctt cattgatctc tgttactcct ctgttttcac 120

tcccaaaatg ctaatgaact ttgtgtcaaa aaagaatatt atctccaatg ttgggtgcat 180

gactcggctg tttttcttct tctttttcgt catctctgaa tgttacatgt tgacctcaat 240

ggcataatgat cgctatgtgg ccatctgtaa tccattgctg tataagggtca ccatgtccca 300

tcagggtctgt tctatgctca cttttgctgc ttacataatg ggattggctg gagccacggc 360

ccacaccggg tgcattgta gactcacctt ctgcagtgt aatatcatta accattactt 420

gtgtgacata ctccccctcc tccagctttc ctgcaccagc acctatgtca acgagggtgg 480

tgttttcatt gttgtgggta ctaatatcac ggtaccagc tgtaccatcc tcatttctta 540

tgttttcatt gtcactagca ttcttcatat caaatccact caaggaagat caaaagcctt 600

cagtacttgt agctctcatg tcattgctct gtctctg 637

<210> 27

<211> 637

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

catggtaggc aaccttggct tgatcattct tttcggctca aattctcacc tccacacacc 60

aatgtactat ttctcttca atctctcctt cattgatctc tgttactcct ctgttttcac 120

tcccaaatg ctaatgaact ttgtatcaaa aaagaatatt atctcctatg ttgggtgcat 180

gactcagctg tttttctttc tctttttgt catctctgaa tgctacatat tgacctcaat 240

ggcatatgat cgctatgtgg ccatctgtaa tccattgctg tataaggta ccatgtccca 300

tcaggctctg tctatgtca cttttgctgc ttacataatg ggattggctg gagccacggc 360

ccacaccggg tgcattgcta gactcacctt ctgcagtgt aatatcatca accattactt 420

gtgtgacata ctccccctcc tccagctttc ctgcaccagc acctatgtca acgagggtgt 480

tggttctcatt gttgtgggta ttaatatcat ggtaccagcgt tgtaccatcc tcatttctta 540

tggttttcatt gtcactagca ttcttcatat caaatccact caaggaagat caaaagcctt 600

cagtacttgt agctctcatg tcattgctct gtctctg 637

<210> 28

<211> 509

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

cctttataga tctctgttat tcctgtgtgt ttacccccaa aatgctgaat gactttgttt 60

cagaaagtat catctcttat gtgggatgta tgactcagct atttttcttc tgtttctttg 120

tcaattctga gtgctatgtg ttggtatcaa tggcctatga tcgctatgtg gccatctgca 180

acccctgtct ctacatggtc accatgtccc caagggtctg ctttctgctg atgtttggtt 240

cctatgttgt agggtttgct ggggccatgg cccacactgg aagcatgctg cgactgacct 300

tctgtgattc caacgtcatt gaccattatc tgtgtgacgt tctccccctc ttgcagctct 360

cctgcaccag caccatgtc agtgagctgg tatttttcat tgttgttga gtaatcacca 420

tgctatccag cataagcatc gtcattcttt acgctttgat actctccaac atcctctgta 480

ttccttctgc agagggcaga tccaaagcc

509

【図面の簡単な説明】

【図1】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR11-1の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。11-1-S2プライマーを右向きの矢線で示し、11-1-A3プライマーを左向きの矢線で示した。

【図2】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR11-2の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。11-2-S2プライマーを右向きの矢線で示し、11-2-A2プライマーを左向きの矢線で示した。

【図3】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR11-3の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。11-3-S2プライマーを右向きの矢線で示し、11-3-A2プライマーを左向きの矢線で示した。

【図4】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR11-4の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。11-4-S2プライマーを右向きの矢線で示し、11-4-A2プライマーを左向きの矢線で示した。

【図5】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR11-1の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I (Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;脳、10;心臓、11;腎臓、12;肝臓、13;肺、14;脾臓、15;胎盤、16;骨格筋、17;結腸、18;卵巣、19;末梢血白血球、20;前立腺、21;小腸、22;脾臓、23;精巣、24;胸腺。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型と

した陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図6】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR11-2の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I (Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;脳、10;心臓、11;腎臓、12;肝臓、13;肺、14;脾臓、15;胎盤、16;骨格筋、17;結腸、18;卵巣、19;末梢血白血球、20;前立腺、21;小腸、22;脾臓、23;精巣、24;胸腺。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型とした陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図7】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR11-3の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I (Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;脳、10;心臓、11;腎臓、12;肝臓、13;肺、14;脾臓、15;胎盤、16;骨格筋、17;結腸、18;卵巣、19;末梢血白血球、20;前立腺、21;小腸、22;脾臓、23;精巣、24;胸腺。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型とした陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図8】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR11-4の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel (Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I (Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II (Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;

胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;脳、10;心臓、11;腎臓、12;肝臓、13;肺、14;脾臓、15;胎盤、16;骨格筋、17;結腸、18;卵巣、19;末梢血白血球、20;前立腺、21;小腸、22;脾臓、23;精巣、24;胸腺。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型とした陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図9】 5' -RACE、及び3' -RACEによって得られた産物を複合した、GTAR11-1 cDNA の塩基配列を示した。また、GTAR11-1がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V)。

【図10】 5' -RACE、及び3' -RACEによって得られた産物をを複合した、GTAR11-2 cDNA の塩基配列を示した。また、GTAR11-2がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V, -VI, -VII)。

【図11】 5' -RACE、及び3' -RACEによって得られた産物をを複合した、GTAR11-3 cDNA の塩基配列を示した。また、GTAR11-3がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V, -VI, -VII)。

【図12】 5' -RACE、及び3' -RACEによって得られた産物を複合した、GTAR11-4 cDNA の塩基配列を示した。また、GTAR11-4がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V, -VI, -VII)。

【図13】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR11-1のアミノ酸配列比較を記載した。4種類の配列のうち3種類以上が一致する配列に影塗りを施した。また、4種類全てに保存された配列の下に点を施した。また、糖修飾を受ける[N-x-S/T](xは任意のアミノ酸)モチーフの「N」、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基、および細胞内のG蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の[M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C]配列中の「D-R-Y」をアンダーラインで示した。図中の記号は下記の通りである。

OLF1 ; ヒト Olfactory 受容体 1 (GenBank Accession# U56420)、OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、11-1 ; GTAR11-1。

【図 1 4】 既知ヒトOlfactory受容体とGTAR11-2のアミノ酸配列比較を記載した。3種類全てに保存された配列を点で示した。また、糖修飾を受ける [N-x-S / T] (x は任意のアミノ酸) モチーフの「N」、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基、および細胞内のG 蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の [M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C] 配列中の「D-R-Y」をアンダーラインで示した。図中の記号は下記の通りである。

OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、11-2 ; GTAR11-2。

【図 1 5】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR11-3のアミノ酸配列比較を記載した。3種類全てに保存された配列の下に点を施した。また、糖修飾を受ける [N-x-S / T] (x は任意のアミノ酸) モチーフの「N」、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基、および細胞内のG 蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の [M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C] 配列中の「D-R-Y」をアンダーラインで示した。図中の記号は下記の通りである。

OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、11-3 ; GTAR11-3。

【図 1 6】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR11-4のアミノ酸配列比較を記載した。3種類全てに保存された配列の下に点を施した。また、糖修飾を受ける [N-x-S / T] (x は任意のアミノ酸) モチーフの「N」、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基、および細胞内のG 蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の [M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C] 配列中の「D-R-Y」をアンダーラインで示した。図中の記号は下記の通りである。

OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒ

特平 1 0 - 3 4 7 5 4 6

ト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、 11-4 ; GTAR11-4。

【書類名】 図面

【図 1】

1 CAGCAGCTTGTCTTCGTCGATTTCTGCTATTCCCTCTGTCATTACTCCCA
 51 AAATGCTGGTGAACCTTCCTAGGAAAGAAGAATACAATCCTTTACTCTGAG
 101 TGCATGGTCCAGCTCTTTTTCTTTGTGGTCTTTGTGGTGGCTGAGGGTTA
 151 CCTCCTGACTGCCATGGCATATGATCGCTATGTTGCCATCTGTAGCCAC
 201 TGCTTTATAATGCGATCATGTCCCTCATGGGTCTGCTCACTGCTAGTGCTG
 251 GCTGCCCTTCTTCTTGGGCTTTCTCTCTGCCCTGACTCATAAAGTGCCAT
 301 GATGAAACTGTCCTTTTGCAAATCCACATTATCAACCATTACTTCTGTG
 351 ATGTTCTTCCCCTCCTCAATCTCTCCTGCTCCAACACACACCTCAATGAG
 401 CTTCTACTTTTATCATTGCGGGGTTTAACACCTTGGTGCCACCCCTAGC

【図 2】

1 CATGGTAGGCAACCTTGGCTTGATCACTCTTTTCGGTCTAAATTCTCACC
 51 TCCACACACCAATGTACTATTTCCCTCTTCAATCTCTCCTTCATTGATCTC
 101 TGTTACTCCTCTGTTTTCACTCCCAAAATGCTAATGAACTTTGTGTCAAA
 151 AAAGAATATTATCTCCAATGTTGGGTGCATGACTCGGCTGTTTTTCTTTC
 201 TCTTTTTTCGTCATCTCTGAATGTTACATGTTGACCTCAATGGCATATGAT
 251 CGCTATGTGGCCATCTGTAATCCATTGCTGTATAAGGTCACCATGTCCCA
 301 TCAGGTCTGTTCTATGCTCACTTTTGCTGCTTACATAATGGGATTGGCTG
 351 GAGCCACGGCCACACCGGGTGCATGTTTAGACTCACCTTCTGCAGTGCT
 401 AATATCATTAACCATTACTTGTGTGACATACTCCCCCTCCTCCAGCTTTC
 451 CTGCACCAGCACCTATGTCAACGAGGTGGTTGTTCTCATTGTTGTGGGTA
 501 CTAATATCACGGTACCCAGTTGTACCATCCTCATTTCCTATGTTTTTCATT
 551 GTCACTAGCATTCTTCATATCAAATCCACTCAAGGAAGATCAAAAGCCTT
 601 CAGTACTTGTAGCTCTCATGTCATGCTCTGTCTCTG

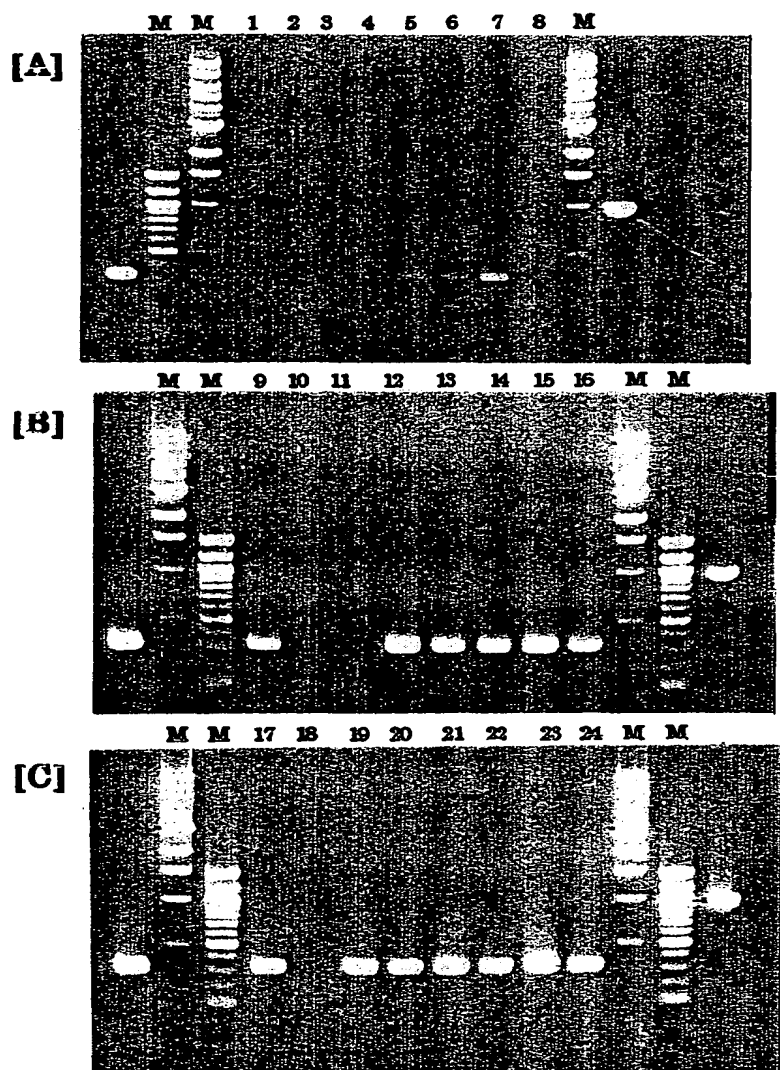
【図 3】

1 CATGGTAGGCAACCTTGGCTTGATCATTCCTTTTCGGTCTAAATTCTCACC
51 TCCACACACCAATGTACTATTTCCCTCTTCAATCTCTCCTTCATTGATCTC
101 TGT TACTCCTCTGTTTTTCACTCCCAAATGCTAATGAAC TTGTATCAAA
151 AAAGAATATTATCTCCTATGTTGGGTGCATGACTCAGCTGTTTTTCTTTT
201 TCTTTTTTGTCACTCTCTGAATGCTACATATTGACCTCAATGGCATATGAT
251 CGCTATGTGGCCATCTGTAATCCATTGCTGTATAAGGTCACCATGTCCCA
301 TCAGGTCTGTTCTATGCTCACTTTTTGCTGCTTACATAATGGGATTGGCTG
351 GAGCCACGGCCACACCGGGTGCATGCTTAGACTCACCTTCTGCAGTGCT
401 AATATCATCAACCATTACTTGTGTGACATACTCCCCCTCCTCCAGCTTTT
451 CTGCACCAGCACCTATGTCAACGAGGTGGTTGTTCTCATTGTTGTGGGTA
501 TTAATATCATGGTACCCAGTTGTACCATCCTCATTTCTTATGTTTTTCATT
551 GTCACTAGCATTCCTTCATATCAAATCCACTCAAGGAAGATCAAAGCCTT
601 CAGTACTTGTAGCTCTCATGTCATTGCTCTGTCTCTG

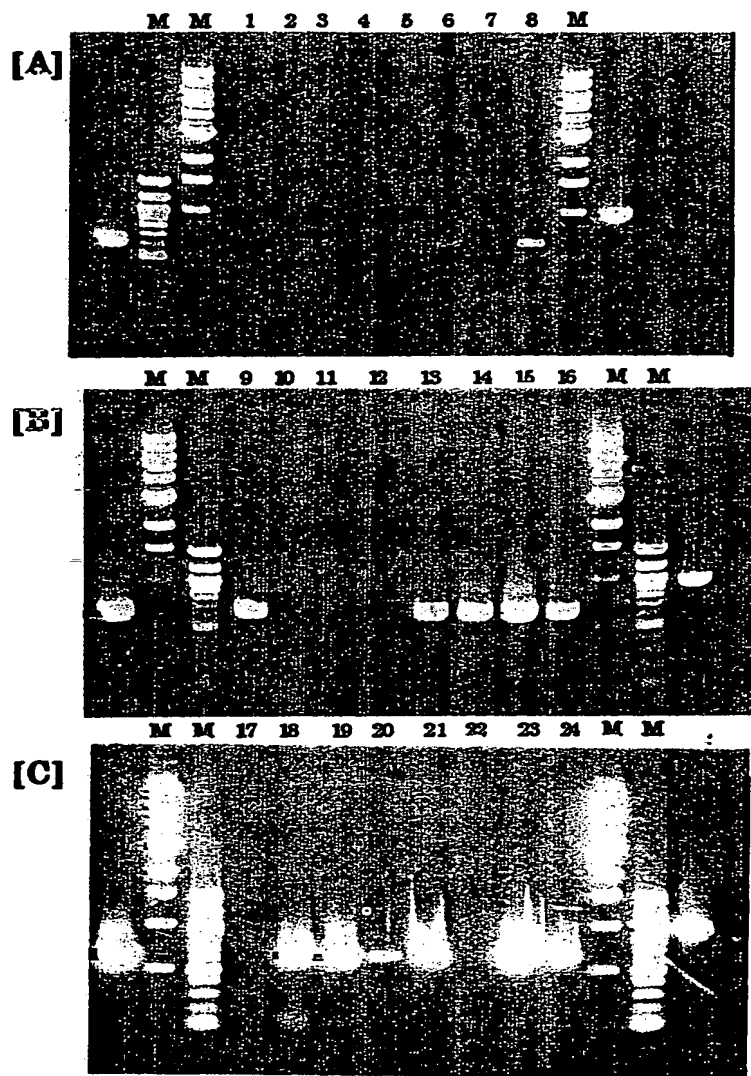
【図 4】

1 CCTTTATAGATCTCTGTTATTCCTGTGTGTTTACCCCCAAAATGCTGAAT
51 GACTTTGTTTCAGAAAGTATCATCTCTTATGTGGGATGTATGACTCAGCT
101 ATTTTCTTCTGTTTCTTTGTCAATTCTGAGTGCTATGTGTTGGTATCAA
151 TGGCCTATGATCGCTATGTGGCCATCTGCAACCCCCCTGCTCTACATGGTC
201 ACCATGTCCCCAAGGGTCTGCTTTCTGCTGATGTTTGGTTCCTATGTGGT
251 AGGGTTTGCTGGGGCCATGGCCACACTGGAAGCATGCTGCGACTGACCT
301 TCTGTGATTCCAACGTCATTGACCATTATCTGTGTGACGTTCTCCCCCTC
351 TTGCAGCTCTCCTGCACCAGCACCCATGTCAGTGAGCTGGTATTTTTTCAT
401 TGTTGTTGGAGTAATCACCATGCTATCCAGCATAAGCATCGTCATCTCTT
451 ACGCTTTGATACTCTCCAACATCCTCTGTATTCTTCTGCAGAGGGCAGA
501 TCCAAAGCC

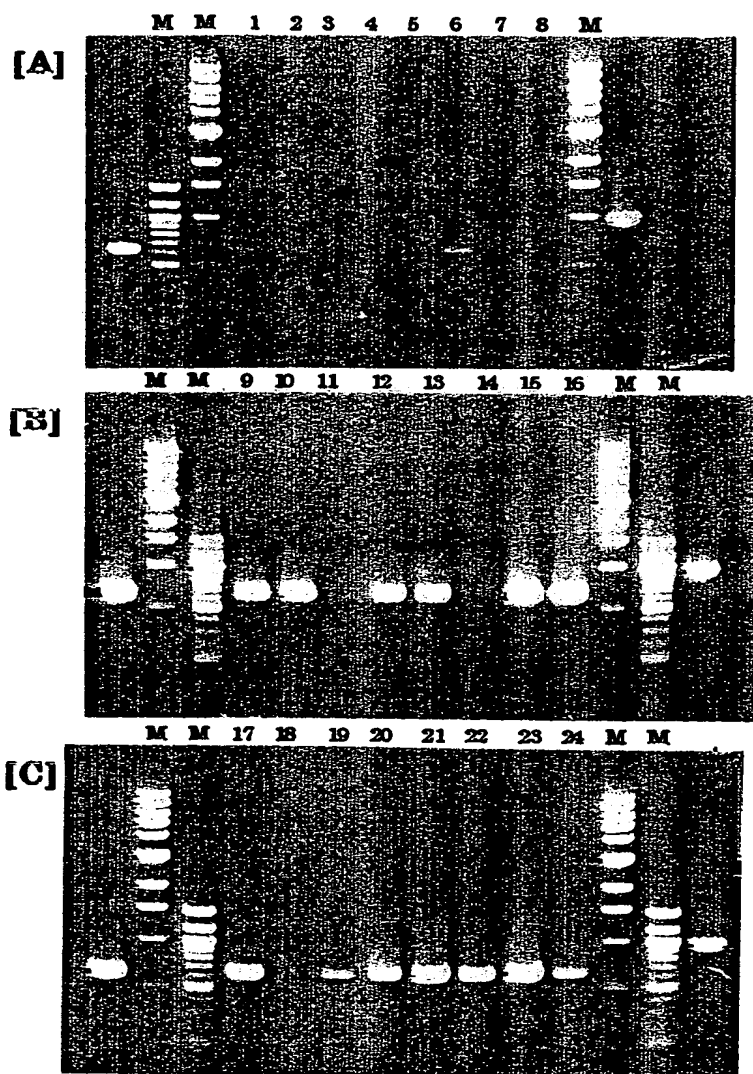
【図5】



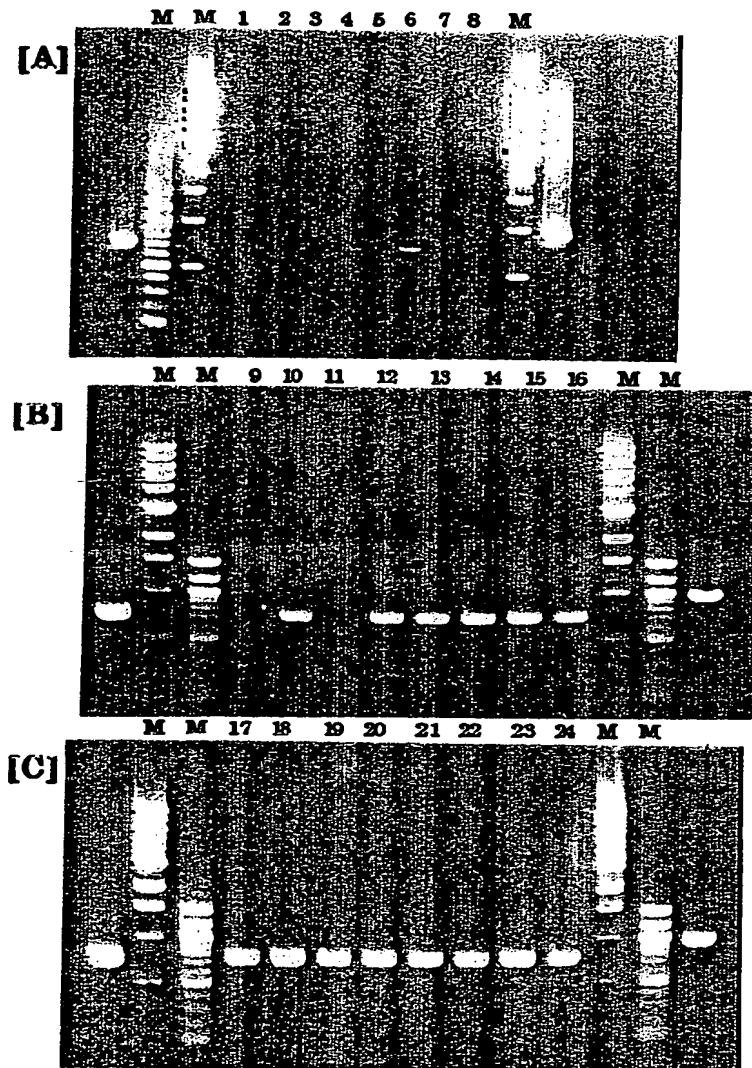
【図 6】



【図7】



【図 8】



【図 9】

1 AAATGCCTAAAGAAGAATGACCATGGAAAATTATTCTATGGCAGCTCAGTTTGTCTTAGA
MetThrMetGluAsnTyrSerMetAlaAlaGlnPheValLeuAsp

61 TGGTTTAACACAGCAAGCAGAGCTCCAGCTGCCCCCTCTTCCTCCTGTTCTCGGAATCTA
GlyLeuThrGlnGlnAlaGluLeuGlnLeuProLeuPheLeuLeuPheLeuGlyIleTyr

121 TGTGGTCACAGTAGTGGGCAACCTGGGCATGATTCTCCTGATTGCAGTCAGCCCTCTACT
ValValThrValValGlyAsnLeuGlyMetIleLeuLeuIleAlaValSerProLeuLeu
TM-I

181 TCACACCCCATGTACTATTTCTCAGCAGCTTGTCCTTCGTCGATTTCTGCTATTCTCTC
HisThrProMetTyrTyrPheLeuSerSerLeuSerPheValAspPheCysTyrSerSer
TM-II

241 TGTCATTACTCCCAAATGCTGGTGAACCTCCTAGGAAAGAAGAATACAATCCTTTACTC
ValIleThrProLysMetLeuValAsnPheLeuGlyLysLysAsnThrIleLeuTyrSer

301 TGAGTGCATGGTCCAGCTCTTTTTCTTTGTGGTCTTTGTGGTGGCTGAGGGTTACCTCCT
GluCysMetValGlnLeuPhePhePheValValPheValValAlaGluGlyTyrLeuLeu
TM-III

361 GACTGCCATGGCATATGATCGCTATGTTGCCATCTGTAGCCCACTGCTTTATAATGCGAT
ThrAlaMetAlaTyrAspArgTyrValAlaIleCysSerProLeuLeuTyrAsnAlaIle

421 CATGTCCTCATGGGTCTGCTCACTGCTAGTGTGGCTGCCTTCTTCTTGGGCTTTCTCTC
MetSerSerTrpValCysSerLeuLeuValLeuAlaAlaPhePheLeuGlyPheLeuSer
TM-IV

481 TGCCTTGACTCATAAAGTGCCATGATGAAACTGTCCTTTTGCAAATCCACATTATCAA
AlaLeuThrHisThrSerAlaMetMetLysLeuSerPheCysLysSerHisIleIleAsn

541 CCATTACTTCTGTGATGTTCTTCCCCTCCTCAATCTCTCCTGCTCCAACACACACCTCAA
HisTyrPheCysAspValLeuProLeuLeuAsnLeuSerCysSerAsnThrHisLeuAsn

601 TGAGCTTCTACTTTTATCATTGCGGGGTTAACACCTTGGTGCCCACTAGCTGTTGC
GluLeuLeuLeuPheIleIleAlaGlyPheAsnThrLeuValProThrLeuAlaValAla
TM-V

661 TGTCTCCTATGCCTTCATCCTCTACAGCATCCTTCACATCOGCTCCTCAGAGGGCOGGTC
ValSerTyrAlaPheIleLeuTyrSerIleLeuHisIleArgSerSerGluGlyArgSer

721 CAAAGCTTTTGGAACATGCAGCTCTCATCTCATGGCTGTGGT
LysAlaPheGlyThrCysSerSerHisLeuMetAlaVal

【図 10】

1 ATTTTGAAGACAAAAATGCTGGCTAGAAACAACTCCTTAGTGACTGAATTTATCTTG
MetLeuAlaArgAsnAsnSerLeuValThrGluPheIleLeuAla

61 CTGGATTAACAGATCGTCCAGAGTTCTGGCAACCCCTTCTTTTCTGTTCCCTAGTGATCT
GlyLeuThrAspArgProGluPheTrpGlnProPhePhePheLeuPheLeuValIleTyr

121 ACATGTGCACCATGGTAGGCAACCTTGGCTTGATCACTCTTTTGGGTCTAAATTCTCACC
IleValThrMetValGlyAsnLeuGlyLeuIleThrLeuPheGlyLeuAsnSerHisLeu
TM-I

181 TCCACACCAATGTACTATTTCTCTTCAATCTCTCCTTCATTGATCTCTGTTACTCCT
HisThrProMetTyrTyrPheLeuPheAsnLeuSerPheIleAspLeuCysTyrSerSer
TM-II

241 CTGTTTTCCTACTCCCAAATGCTAATGAACCTTGTGTCAAAAAGAATATTATCTCCAATG
ValPheThrProLysMetLeuMetAsnPheValSerLysLysAsnIleIleSerAsnVal

301 TTGGGTGCATGACTGGCTGTTTTCTTTCTCTTTTTCGTCTCTGAATGTTACATGT
GlyCysMetThrArgLeuPhePhePheLeuPhePheValIleSerGluCysTyrMetLeu
TM-III

361 TGACCTCAATGGCATATGATCGCTATGTGGCCATCTGTAATCCATTGCTGTATAAGGTCA
ThrSerMetAlaTyrAspArgTyrValAlaIleCysAsnProLeuLeuTyrLysValThr

421 CCATGTCCCATCAGGTCTGTTCTATGCTCACTTTTGCTGCTTACATAATGGGATTGGCTG
MetSerHisGlnValCysSerMetLeuThrPheAlaAlaTyrIleMetGlyLeuAlaGly
TM-IV

481 GAGCCACGGCCACACCGGGTGCATGTTAGACTCACCTTCTGCAGTGCTAATATCATTA
AlaThrAlaHisThrGlyCysMetPheArgLeuThrPheCysSerAlaAsnIleIleAsn

541 ACCATTACTGTGTGACATACTCCCCCTCCTCCAGCTTTCCTGCACCAGCACCTATGTCA
HisTyrLeuCysAspIleLeuProLeuLeuGlnLeuSerCysThrSerThrTyrValAsn

601 ACGAGGTGGTTGTTCTCATGTGTGGGTACTAATATCACGGTACCCAGTTGTACCATCC
GluValValValLeuIleValValGlyThrAsnIleThrValProSerCysThrIleLeu
TM-V

661 TCATTTCTTATGTTTTTCATTGTCTACTAGCATCTTCATATCAAATCCACTCAAGGAAGAT
IleSerTyrValPheIleValThrSerIleLeuHisIleLysSerThrGlnGlyArgSer

721 CAAAAGCCTTCAGTACTGTAGCTCTCATGTTCATTGCTCTGTCCTGTTTTTGGGTCAG
LysAlaPheSerThrCysSerSerHisValIleAlaLeuSerLeuPhePheGlySerAla
TM-VI

781 CGGCATTTCATGTATATTAAATATTCTTCTGGATCTATGGAGCAGGAAAAGTTTTTCTG
AlaPheMetTyrIleLysTyrSerSerGlySerMetGluGlnGlyLysValPheSerVal

841 TTTTCTACACTAATGTGGTGCCCATGCTCAATCCCCTCATCTACAGTTTGAGGAACAAGG
PheTyrThrAsnValValProMetLeuAsnProLeuIleTyrSerLeuArgAsnLysAsp
TM-VII

901 ATGTCAAAGTTGCACTGAGGAAAGCTCTGATTAAAATTCAGAGGAGAAATATATTCTAAT
ValLysValAlaLeuArgLysAlaLeuIleLysIleGlnArgArgAsnIlePhe***

961 TAGAAGCAGTAATGATGTAAACAATTGAAGGACTTCAAATTTTTATTAGTGTTCAT

1021 GAAGAGATTTTGTGTCTTCTACAGATGGTGTATGTGTGATTTAATAAA

【図 1 1】

1 ATTTTGAAGACAAAAATGCTGGCTAGAAACAACCTCCTTAGTGACTGAATTTATTCTTG
MetLeuAlaArgAsnAsnSerLeuValThrGluPheIleLeuAla

61 CTGGATTAACAGATCGTCCAGAGTCCGGCAACCCCTCTTTTCTGTTTCTAGTGATCT
GlyLeuThrAspArgProGluPheArgGlnProLeuPhePheLeuPheLeuValIleTyr

121 ACATTGTCACCATGGTAGGCAACCTTGGCTTGATCATTCTTTTGGTCTAAATTCTCACC
IleValThrMetValGlyAsnLeuGlyLeuIleIleLeuPheGlyLeuAsnSerHisLeu
TM-I

181 TCCACACACCAATGTACTATTTCTCTCAATCTCTCCTTCATTGATCTCTGTTACTCCT
HisThrProMetTyrTyrPheLeuPheAsnLeuSerPheIleAspLeuCysTyrSerSer
TM-II

241 CTGTTTTCACTCCCAAATGCTAATGAACCTTGTATCAAAAAGAATATTATCTCCTATG
ValPheThrProLysMetLeuMetAsnPheValSerLysLysAsnIleIleSerTyrVal

301 TTGGGTGCATGACTCAGCTGTTTTCTTCTCTTTTTTGTTCATCTCTGAATGCTACATAT
GlyCysMetThrGlnLeuPhePhePheLeuPhePheValIleSerGluCysTyrIleLeu
TM-III

361 TGACCTCAATGGCATATGATCGCTATGTGGCCATCTGTAATCCATTGCTGTATAAGGTCA
ThrSerMetAlaTyrAspArgTyrValAlaIleCysAsnProLeuLeuTyrLysValThr

421 CCATGTCCCATCAGGTCTGTTCTATGCTCACTTTTGCTGCTTACATAATGGGATTGGCTG
MetSerHisGlnValCysSerMetLeuThrPheAlaAlaTyrIleMetGlyLeuAlaGly
TM-IV

481 GAGCCACGGCCACACCGGGTGCATGCTTAGACTCACCTTCTGCAGTGCTAATATCATCA
AlaThrAlaHisThrGlyCysMetLeuArgLeuThrPheCysSerAlaAsnIleIleAsn

541 ACCATTACTTGTGTGACATACTCCCCCTCCTCCAGCTTTCCTGCACCAGCACCTATGTCA
HisTyrLeuCysAspIleLeuProLeuLeuGlnLeuSerCysThrSerThrTyrValAsn

601 ACGAGGTGGTTGTTCTCATTGTTGTGGGTATTAATATCATGGTACCCAGTTGTACCATCC
GluValValValLeuIleValValGlyIleAsnIleMetValProSerCysThrIleLeu
TM-V

661 TCATTTCTTATGTTTTTTCATTGTCACTAGCATTCTTCATATCAAATCCACTCAAGGAAGAT
IleSerTyrValPheIleValThrSerIleLeuHisIleLysSerThrGlnGlyArgSer

721 CAAAAGCCTTCAGTACTTGTAGCTCTCATGTCATTGCTCTGCTCTGTTTTTGGGTCAG
LysAlaPheSerThrCysSerSerHisValIleAlaLeuSerLeuPhePheGlySerAla
TM-VI

781 CGGCATTTCATGTATATTAAATATTCTTCTGGATCTATGGAGCAGGAAAAGTTTCTTCTG
AlaPheMetTyrIleLysTyrSerSerGlySerMetGluGlnGlyLysValSerSerVal

841 TTTTCTACACTAATGTGGTGCCCATGCTCAATCCTCTCATCTACAGTTTGAGGAACAAGG
PheTyrThrAsnValValProMetLeuAsnProLeuIleTyrSerLeuArgAsnLysAsp
TM-VII

901 ATGTCAAAGTTGCACTGAGGAAAGCTCTGATTAAAATTGAGAGAAGAAATATATTCTAAT
ValLysValAlaLeuArgLysAlaLeuIleLysIleGlnArgArgAsnIlePhe***

961 TAGAAGCAGTAATAATGTAAAACGATTGAAGAACTTTAAATTTTATTAGTGTGTTCCAT

1021 GAAGAGATTTTGTGTTTCTACAGATGGTGTATGTGTGATTTAATAAA

【図 12】

1 ACAGCTCGCCAAGAGAGAATGACTCTGAGAAACAGCTCCTCAGTGACTGAGTTTATCCTT
MetThrLeuArgAsnSerSerSerValThrGluPheIleLeu

61 GTGGGATTATCAGAACAGCCAGAGCTCCAGCTCCCTCTTTTCCTTCTATTCTTAGGGATC
ValGlyLeuSerGluGlnProGluLeuGlnLeuProLeuPheLeuLeuPheLeuGlyIle

121 TATGTGTCACTGTGGTGGGCAACTTGGGCTTGATCACCTTAATTGGGATAAATCCTAGC
TyrValPheThrValValGlyAsnLeuGlyLeuIleThrLeuIleGlyIleAsnProSer
TM-I

181 CTTCACACCCCATGTACTTTTCTCTTCAACTTGTCTTTATAGATCTCTGTTATTCC
LeuHisThrProMetTyrPhePheLeuPheAsnLeuSerPheIleAspLeuCysTyrSer
TM-II

241 TGTGTGTTTACCCCAAAATGCTGAATGACTTTGTTTCAGAAAGTATCATCTCTTATGTG
CysValPheThrProLysMetLeuAsnAspPheValSerGluSerIleIleSerTyrVal

301 GGATGTATGACTCAGCTATTTTCTTCTGTTTCTTTGTCAATTCTGAGTGCTATGTGTTG
GlyCysMetThrGlnLeuPhePhePheCysPhePheValAsnSerGluCysTyrValLeu
TM-III

361 GTATCAATGGCCTATGATCGCTATGTGGCCATCTGCAACCCCTGCTCTACATGGTCACC
ValSerMetAlaTyrAspArgTyrValAlaIleCysAsnProLeuLeuTyrMetValThr

421 ATGTCCCAAGGGTCTGCTTTCTGCTGATGTTTGGTTCTATGTGGTAGGGTTGCTGGG
MetSerProArgValCysPheLeuLeuMetPheGlySerTyrValValGlyPheAlaGly
TM-IV

481 GCCATGGCCCACTGGAAGCATGCTGCGACTGACCTTCTGTGATTCCAACGTCATTGAC
AlaMetAlaHisThrGlySerMetLeuArgLeuThrPheCysAspSerAsnValIleAsp

541 CATTATCTGTGTGACGTTCTCCCCCTCTTGCAGCTCTCTGCACCAGCACCCATGTCAGT
HisTyrLeuCysAspValLeuProLeuLeuGlnLeuSerCysThrSerThrHisValSer

601 GAGCTGGTATTTTTTCATGTGTGTTGGAGTAATCACCATGCTATCCAGCATAAGCATCGTC
GluLeuValPhePheIleValValGlyValIleThrMetLeuSerSerIleSerIleVal
TM-V

661 ATCTCTTACGCTTTGATACTCTCCAACATCCTCTGTATTCTTCTGCAGAGGGCAGATCC
IleSerTyrAlaLeuIleLeuSerAsnIleLeuCysIleProSerAlaGluGlyArgSer

721 AAAGCCTTTAGCACATGGGGCTCCACATAATTGCTGTGCTCTGTTTGGGTTCAGGG
LysAlaPheSerThrTrpGlySerHisIleIleAlaValAlaLeuPhePheGlySerGly
TM-VI

781 ACATTACCTACTTAACAACATCTTTTCTGGCTCTATGAACCATGGCAGATTGCTCA
ThrPheThrTyrLeuThrThrSerPheProGlySerMetAsnHisGlyArgPheAlaSer

841 GTCTTTTACACCAATGTGGTTCCCATGCTTAACCTTCGATCTACAGTTGAGGAATAAG
ValPheTyrThrAsnValValProMetLeuAsnProSerIleTyrSerLeuArgAsnLys
TM-VII

901 GATGATAAACTTGCCCTGGGCAAAACCCCTGAAGAGAGTGCTCTTCTAATGGGTCTCTTCA
AspAspLysLeuAlaLeuGlyLysThrLeuLysArgValLeuPhe***

961 TATCACTGGCAACCGA

【図 13】

OLF1	MEFTD-RNYT	-LVTEFILLG	FPTRPELQIV	LFLMFLTYA	IILIGNIGLM	LLIRIDPHLO
OLF2	M---D--NQS	S-TPGFLLLG	FSEHPGLGRT	LFVDVITSYL	LTIVGNTLII	LLSALDTKLH
OLF3	MG-TD--NOT	-WVSEFILLG	LSSDWDTRVS	LFVLFLVMYV	VTVLGNCLIV	LLIRLDSRLH
11-1	ME-----NYS	M-AAQFVLDG	LTQQAELQLP	LPLLFLGIYV	VTVVGNLGM	LLIAVSPILLH
	*	*		**	*	**
OLF1	TPMYFFLSNL	SFVDLCYFSD	IVPKMLVNFL	SENKSIYYG	CALQYFFCT	FADTESFILA
OLF2	SPMYFFLSNL	SFLDLCFTTS	CVPQMLANLW	GPKKTISFLD	CSVQIFIFLS	LGTTECILMK
OLF3	TPMYFFLTNL	SLVDVSYATS	VVPQLLAHFL	AEHKAIPFQS	CAAQLFFSLA	LGGIEFVLLA
11-1	TPMYFFLSSL	SFVDFCYSSV	ITPKMLVNFL	GKKNLILYSE	CMVOLFFFWV	FVVAEGYLLT
	***	***	*	*	*	*
OLF1	AMAYDRYVAI	CNPLLYTVVM	SRGICMRLIV	LSYLGGMSS	LVHTSFAFIL	KYCDKNVINH
OLF2	VMAFDRIYAV	CQPLHYATII	HPRLCNQLAS	VAWVIGLVGS	VVQTPSTLHL	PFCPDRQVDD
OLF3	VMAYDRYVAV	CDALRYSAIM	HGGLCARLAI	TSWVSGFISS	PVQTAITFOL	PMCRNKFIDH
11-1	AMAYDRYVAI	CSPLLYNAIM	SSWVCSLLVL	AAFFLGFLSA	LTHTSAMMKL	SFCKSHIINH
	**	*****	*	*	*	*
OLF1	FFCDLPPLLK	LSCTDTTINE	WLLSTYGSSV	EIICFIIIII	SYFFILLSVL	KIRSFSGRKK
OLF2	FVCEVPALIR	LSCEDTSYNE	IQAVASVFI	LVVPLSLILV	SYGAIWAVL	RINSATAWRK
OLF3	ISCELLAVVR	LACVDTSSNE	VTIMVSSIIV	LMTPLCLVLL	SYIQIISTIL	KIQSREGRKK
11-1	YFCDVLPILN	LSCSNTHLNE	LLLFIAGFN	TLVPTLAVAV	SYAFILYSIL	HIRSSEGRSK
	*	*	*	*	*	*
OLF1	TFSTCASHLT	SVTIYQGTLL	FIYSRPSYLY	SPNTDKIISV	FYTIFIPVLN	PLIYSLRNKD
OLF2	AFGTCSSHLT	VVTLFYSSVI	AVYLQPKNPY	AQGRGKFFGL	FYAVGTPSLN	PLVYTLRNKE
OLF3	AFHTCASHLT	VVALCYGVAI	FTYIQPHSSP	SVLQEKLFVS	FYAILTPMLN	PMIYSLRNKE
11-1	AFGTCSSHLM	AV				
	*	*	*	*	*	*
OLF1	VKDAAEKVLR	SKVDS--S				
OLF2	IKRALRRLLG	KERDSRESWR	AA			
OLF3	VKGAWQKLLW	KFSG-LTSKL	AT			
11-1						

【図 1 4】

```

OLF2    M---DNQ SSTPGFLLLG FSEHPGLGRT LFVDVITSYL LTLVGNTLII LLSALDTKLH
OLF3    MGT-DNQ TWVSEFILLG LSSDWDTRVS LFVLFLVMYV VTVLGNCLIV LLIRLDSRLH
11-2    MLAR-NN SLVTEFILAG LTDRPEFWQP FFFLFLVIYI VTMVGNLGLI TLFGLNSHLH
          *   *       * * *           *   *   * **   *       **
OLF2    SPMYFFLSNL SFLDLCFTTS CVPQMLANLW GPKKTISFLD CSVQIFIFLS LGTTECILMK
OLF3    TPMYFFLTNL SLVDVSYATS VVPQLLAHFL AEHKAIPFQS CAAQLFFSLA LGGIEFVLLA
11-2    TPMYFFLFNL SFIDLCYSSV FTPKMLMNFV SKKNIISNVG CMTRLFFFLF FVISECYMLT
          *** ** * * *   *   *           *   *   * *   *
OLF2    VMAFDRYVAV CQPLHYATII HPRLCWQLAS VAWVIGLVGS VVQTPSTLHL PFCPDRQVDD
OLF3    VMAYDRYVAV CDALRYSAIM HGGLCARLAI TSWVSGFISS PVQTAITFQL PMCRNKFIDH
11-2    SMAYDRYVAI CNPLLYKVTM SHQVCSMLTF AAYIMGLAGA TAHTGCMFRL TFCSANIINH
          ** ***** * * *           *   *           *   *
OLF2    FVCEVPALIR LSCEDTSYNE IQVAVASVFI LVVPLSLILV SYGAITWAVL RINSATAWRK
OLF3    ISCELLAVVR LACVDTSSNE VTIMVSSIVL LMTPLCLVLL SYIQIISTIL KIQSREGRKK
11-2    YLCDILPLLQ LSCTSTYVNE VVVLIVVGTN ITVPSTILI SYVFIVTSIL HIKSTQGRSK
          *           * * * **           *   * ** *   *   *   *
OLF2    AFGTCSSHLT VVTLFYSSVI AVYLQPKNPY AQGRGKFFGL FYAVGTPSLN PLVYTLRNKE
OLF3    AFHTCASHLT VVALCYGVAI FTYIQPHSSP SVLQEKLFVS FYAILTPMLN PMIYSLRNKE
11-2    AFSTCSSHVI ALSLFFGSAA FMYIKY-SSG SMEQGVFSV FYTNVVPMLN PLIYSLRNKD
          ** ** **   *           *           *   * **   * ** * * **
OLF2    IKRALRRLLG KERDSRESWR AA
OLF3    VKGAWQKLLW KFSGL-TSKL AT
11-2    VKVALRKALI KIQ-RRN--I -F
          * *   *   *

```

【図 1 5】

OLF2 M---DNQ SSTPGFLLG FSEHPGLGRT LFVDVITSYL LTLVGNTLII LLSALDTKLH
 OLF3 MGT-DNQ TWVSEFILLG LSSDWDTRVS LFVLFLVMYV VTVLGNCLIV LLIRLDSRLH
 11-3 MLAR-NN SLVTEFILAG LTDRPEFRQP LFFLFLVIYI VTMVGNLGLI ILFGLNSHLH
 * * * * *
 OLF2 SPMYFFLSNL SFLDLCFTTS CVPQMLANLW GPKKTISFLD CSVQIFIFLS LGTTECILMK
 OLF3 TPMYFFLTNL SLVDVSYATS VVPQLLAHFL AEHKAIPFQS CAAQLFFSLA LGGIEFVLLA
 11-3 TPMYYFLFNL SFIDLCYSSV FTPKMLMNFV SKKNIISYVG CMTQLFFFLF FVISECYILT
 *** ** * * * * *
 OLF2 VMAFD~~RY~~VAV CQPLHYATII HPRLCWQLAS VAWVIGLVGS VVQTPSTLHL PFC~~PDR~~QVDD
 OLF3 VMAYD~~RY~~VAV CDALRYSAIM HGGLCARLAI TSWVSGFISS PVQTAITFQL PMCRNKFIDH
 11-3 SMAYD~~RY~~VAI CNPLLYKVTH SHQVCSMLTF AAYINGLAGA TAHTGCMLRL TFC~~SANI~~INH
 ** ***** * * * * *
 OLF2 FVCEVPALIR LSCEDTSYNE IQVAVASVFI LVVPLSLILV SYGAIWAVL RINSATAWRK
 OLF3 ISCELLAVVR LACVDTSNE VTMVSSIVL LMTPLCLVLL SYIQIISTIL KIQSREGRKK
 11-3 YLCDILPLLQ LSCTSTYVNE VVVLIVVGIN INVPSCTILI SYVFIVTSIL HIKSTQGRSK
 * * * * *
 OLF2 AFGTCSSHLT VVTLFYSSVI AVYLQKPNPY AQGRGKFFGL FYAVGTPSLN PLVYTLRNKE
 OLF3 AFHTCASHLT VVALCYGVAI FTYIQPHSSP SVLQEKLFVS FYAILTPMLN PMIYSLRNKE
 11-3 AFSTCSSHVI ALSLFFGSAA FMYIKY-SSG SMEQGVSSV FYTNVVPMLN PLIYSLRNKD
 ** ** * * * * *
 OLF2 IKRALRRLLG KERDSRESWR AA
 OLF3 VKGAWQKLLW KFSGL-TSKL AT
 11-3 VKVALRKALI KIQ-RRN--I -F
 * * * *

【図 1 6】

```

OLF2  M---DNQ SSTPGFLLG FSEHPGLGRT LFVDVITSYL LTLVGNTLII LLSALDTKLH
OLF3  MGT-DNQ TWSEFILLG LSSDWDTRVS LFVFLVMYV VTVLGNCLIV LLIRLDSRLH
11-4  MTLR-NS SSVTEFILVG LSEQPELQLP LFLFLGIYV FTVVGNLGLI TLIGINPSLH
      *  *      * * * *      **      *  * **      *      **
OLF2  SPMYFFLSNL SFLDLCFTTS CVPQMLANLW GPKKTISFLD CSVQIFIFLS LGTTECILMK
OLF3  TPMYFFLTNL SLVDVSYATS VVPQLLAHFL AEHKAIPFQS CAAQLFFSLA LGGIEFVLLA
11-4  TPMYFFLFNL SFIDLCYSCV FTPKMLNDFV SES-IISYVG CMTQLFFFCF FVNSECYVLV
      ***** ** * *      * *      *      * * *      *
OLF2  VMAFDRYVAV CQPLHYATII HPRLCWQLAS VAWVIGLVGS VVQTPSTLHL PFCPDRQVDD
OLF3  VMAYDRYVAV CDALRYSAIM HGGLCARLAI TSWVSGFISS PVQTAITFQL PMCRNKFIDH
11-4  SMAYDRYVAI CNPLLYMVTM SPRVCFLLMF GSYVVGFAA MAHTGSMLRL TFCDSNVIDH
      ** ***** * * *      * *      * *      *      * *      *
OLF2  FVCEVPALIR LSCEDTSYNE IQVAVASVFI LVVPLSLILV SYGAITWAVL RINSATAWRK
OLF3  ISCELLAVVR LACVDTSNE VTINVSSIVL LMTPLCLVLL SYIQIISTIL KIQSREGKK
11-4  YLCDVPLLLQ LSCTSTHVSE LVFFIVGVI TMLSSISIVI SYALILSNIL CIPSAEGRSK
      *      * * * *      ** * *      *
OLF2  AFGTCSSHLT VVTLFYSSVI AVYLQKPNPY AQGRGKFFGL FYAVGTPSLN PLVYTLNKE
OLF3  AFHTCASHLT VVALCYGVAI FTYIQPHSSP SVLQEKLSV FYAILTPMLN PMIYSLNKE
11-4  AFSTWGSIII AVALFFGSGT FTYLTTSFPG SMNHGRFASV FYTNVVPMLN PSIYSLNKD
      ** * **      * *      *      **      * * * *      *
OLF2  IKRALRRLLG KERDSRESWR AA
OLF3  VKGAWQKLLW KFSGL-TSKL AT
11-4  DKLALGKTL- K----R--VL -F
      * *      * *

```


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 データベース上に見出された新規なG蛋白質結合型受容体遺伝子を含むヒトゲノム配列をに基づき設計したオリゴヌクレオチドプライマーを利用して、RT-PCRを行い、標的遺伝子の部分cDNA配列を得た。さらに、ヒト精巣由来のcDNAライブラリーを鋳型とした、5'-RACE法及び3'-RACE法を実施することで、これら遺伝子の完全長cDNAを単離することに成功した。単離した遺伝子がコードする蛋白質は、既知のOlfactory受容体(OR)遺伝子ファミリーの特徴を有していた。また、その発現特性から免疫応答や造血に関連した機能が示唆された。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

596102791

【住所又は居所】

茨城県新治郡新治村永井153番地2

【氏名又は名称】

株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日
[変更理由] 新規登録
住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名 株式会社中外分子医学研究所
